

Aus der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. H. Schuermann

LANE MEDICAL LIBRARY
SAN FRANCISCO

ZUR HISTOCHEMIE DES HODENS UNTER BESONDERER
BERÜCKSICHTIGUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE.

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Joachim Kasten

aus Sulingen/Bremen

Würzburg 1958



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr.med. H. Schuermann

ZUR HISTOCHEMIE DES HODENS UNTER BESONDERER
BERÜCKSICHTIGUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE.

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Joachim Kasten
aus Sulingen/Bremen

Würzburg 1958

Referent:

Professor Dr. med. H. Schuermann

Tag der Promotion:

24. 2. 58

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

MEINEN LIEBEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS:

	Seite
I. Einleitung	1
II. Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Sexualhormone im Rattenhoden	4
III. Histochemische Untersuchung der interstitiellen Zellen des Hodens	8
IV. Vitamin-C-Untersuchungen	14
V. Plasmaluntersuchungen	19
VI. Cholesterin	21
VII. Glycogen	23
VIII. Lipase	25
IX. Durch Östrogene an erwachsenen menschlichen Hoden hervorgerufene morphologische und histochemische Veränderungen	26
X. Alkalische Phosphatase	
1. Kurzer Überblick über die Entwicklung des Phosphatasenachweises	33
2. Biochemische Eigenschaften der Phosphatase	34
3. Der Ablauf der Phosphatasereaktion	35
4. Die Schwierigkeit histochemischer Lokalisation der alkalischen Phosphatase in den Kernen	36
XI. Die Verteilung der alkalischen Phosphatase im Genitaltrakt männlicher Säuger	38
XII. Veränderung in der Verteilung und Konzentration der alkalischen Phosphatase im Gewebe von Ratten nach Hypophysektomie oder Gonadektomie und nach Substitutionstherapie	42
XIII. Eigene Untersuchungen	48
IVX. Besprechung der Ergebnisse	56
VX. Zusammenfassung	57
XVI. Literaturverzeichnis	I

I. EINLEITUNG.

Seit bekannt ist, daß die Sterilität einer Ehe zu einem großen Prozentsatz - nach amerikanischen Autoren sogar zu 40-60 % - dem männlichen Ehepartner zuzuschreiben ist, hat sich das wissenschaftliche Interesse nicht nur den Störungen der weiblichen Fertilität, sondern auch denen des Mannes zugewandt.

Doch man erkannte recht bald, daß mit klinischen Untersuchungsmethoden und der Spermaanalyse keine ausreichende Diagnostik für eine gezielte Therapie zu erlangen war. Hier war ein Einblick in die anatomische und funktionelle Struktur des Hodens notwendig, weshalb sich seit etwa 17 Jahren die Probeexcision aus dem Hoden einen festen Platz in der Diagnose der Fertilitätsstörungen gesichert hat.

Schon im Jahre 1905 berichtete POSNER über eine Methode der Hodenpunktion. Er glaubte Störungen in der Hodenfunktion von denjenigen Aspermien trennen zu können, die durch Abflußhindernis entstanden waren. Tatsächlich konnte er auch in mehreren Fällen die Anwesenheit von lebenden Spermien im Punktat feststellen. Das Ejakulat des Patienten zeigte eine völlige Aspermie.

Die nächsten Literaturangaben stammen von dem Amerikaner M. HUHNER aus dem Jahre 1913, der ebenfalls eine Methode der Hodenpunktion angab. Aber die Menge und Beschaffenheit des so durch die Aspiration gewonnenen Materials war meist ungenügend, auch war das Verfahren als solches nicht ungefährlich, es kam zum Anstechen größerer Gefäße und zu unerwünschten Hämatomen, so daß diese Methode wieder in Vergessenheit geriet.

Erst nach Vertiefung der cytologischen Studien gewann die Biopsie des Hodens wieder an Raum. 1939 gab HOTCHKISS, 1940 CHARNY und LANE-ROBERTS, 1942 JOEL Biopsiemethoden an, die bereits alle von der Nadelpunktion abwichen und eine Freilegung des Hodens voraussetzten.

Doch nicht nur die pathologisch-anatomischen Veränderungen sollten geklärt werden, sondern auch die normal-anatomischen Vorgänge sollten der Beobachtung unterzogen werden. So schrieb u. a. bereits 1875 WALDEYER

in seiner Arbeit "Über Bindegewebszellen", daß hierzu auch große, runde, protoplasmareiche "Bindesubstanzzellen" zählen, wie sie in der sog. Zwischensubstanz des Hodens vorkommen. Auf eine nähere Beschreibung wird nicht eingegangen. "... ich kann es mir ersparen von denselben hier eine ausführliche Schilderung zu geben, da sie bereits vielfach beschrieben worden sind. Die des Hodens, an denen diese Verhältnisse am klarsten vorliegen, z. B. neuerdings von HOFMEISTER, Wiener akad. Sitzungsberichte 1872." Ferner hebt er hervor, "daß die großen runden Zellen der Bindesubstanzen, die Plasmazellen, es sind, welche besonders gern Fett aufnehmen".

Das wissenschaftliche Interesse an diesem Autopsiematerial richtete sich schon damals auf die Lipide oder besser auf die "Fette" im Hoden. LÉYDIG dürfte der erste gewesen sein, der um 1850 die ersten Beobachtungen von "Fettkörnchenklumpen mit eingeschlossenen bläschenförmigen Kernen" im Hodeninterstitium machte. Jene Beobachtungen waren es, die LEYDIG die Veranlassung zur Entdeckung jener Zellen gab, in denen diese Fettkörnchenklumpen eingeschlossen sind und die die Bezeichnung "Zwischenzellen" bekamen. Auch intratubulär hat er als einer der ersten "Fett" gesehen, das er als Degenerationserscheinung auffaßt. 1879 untersuchte JAKOBSEN eine große Anzahl von Hundehoden mittleren Alters, erwähnte aber nur ganz kurz "Fettkörnchen verschiedener Größe in den Zwischenzellen" (KUNZE). v. EBNER untersuchte 1888 das Verhalten des Fettes in den Tubuli seminiferi der geschlechtsreifen Ratte schon genauer. In seiner Arbeit "Zur Spermatogenese bei den Säugetieren" zeigt er den Vorgang einer Fettwanderung vom Fuße der SERTOLI-Zellen in die Protoplasmaappen der Spermatoblasten, bzw. die Protoplasmaanhänge der Spermatischen während deren Umwandlung in Spermien und die Rückwanderung des Fettes nach Abstoßung der Samenfäden.

In einer Arbeit des Jahres 1895 beschäftigte sich v. HANSEMANN mit den Zwischenzellen des Hodens und hebt als erster ausdrücklich den physiologischen Charakter des extra- wie intratubulären Hodenfettes hervor. "Auch die Fettkörnchen, die in den Zellen oft schon im jugendlichen Alter auftreten und unter ganz physiologischen Verhältnissen in den Zellen gefunden werden, sind nicht als regressive Metamorphose im pathologischen Sinne zu verstehen,

sondern gehören zur Natur der Zellen, etwa wie bei den Zellen der Nebennierenrinde."

Bis zur Gegenwart sind die "Fette", bzw. die Lipide Gegenstand von Untersuchungen geblieben. Hinsichtlich weiterer Literatur sei auf die Arbeit von KUNZE und die Dissertation von BUCHLOH verwiesen.

Waren es bis in jüngere Zeit hinein die herkömmlichen Färbe- und Untersuchungsmethoden, die über die Lipide und andere fettähnliche Substanzen Aufschluß geben sollten, mögen doch nicht die neuesten Untersuchungsmethoden unberücksichtigt bleiben. Die Technik schuf eine Möglichkeit, Gewebe und Gewebelemente unter polarisiertem oder ultraviolettem Licht zu betrachten. Beobachtungen in dieser Richtung von KUNZE gehen auf das Jahr 1922 zurück. Auch MONTAGNA berichtet 1952 über Lipoid unter polarisiertem und ultraviolettem Licht.

Doch von noch größerer Bedeutung dürften die neueren Untersuchungen von BURKL aus dem Jahre 1954 sein. Hier werden nicht nur die Lipide im engeren, sondern auch die Fette und fettartigen Substanzen im weiteren Sinn einer fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung unterworfen. Dazu gehört auch das Cholesterin mit seiner Bedeutung für die Bildung von Sexualhormonen. Die BURKLsche Arbeit beschäftigt sich mit dem "fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Sexualhormone im Rattenhoden".

II. FLUORESZENZMIKROSKOPISCHER NACHWEIS DER SEXUALHORMONE IM RATTENHODEN.

Um die Spezifität des fluoreszenzmikroskopischen Nachweises von Geschlechtshormonen genauer festzulegen, hat BURKL nach vorausgegangenen Untersuchungen am Ovar erneut mit Steroiden und anderen Lipoiden in Reinsubstanz Untersuchungen durchgeführt. Zur Beobachtung der Testobjekte und Präparate wurde die Standardeinrichtung von REICHERT (Lampe: HG 100 von Osram) verwendet.

Zur Beobachtung kamen Kristalle reinen Cholesterins, ein amorphes Gemisch von Lezithin, Kephalin und anderen Lipoiden und Testosteron.

Die Modellversuche BURKLs bringen folgende Tatsache klar zum Ausdruck:

1. Zwischen der Fluoreszenz der Geschlechtshormone in konzentrierter Schwefelsäure und der Fluoreszenz von Lipoiden, die als mögliche Begleitstoffe der Geschlechtshormone in den Zellen vorkommen können, besteht ein wesentlicher Unterschied, der ausreicht, die Hormone von den inaktiven Substanzen zu trennen. So verschwindet die nur wenige Sekunden dauernde, schwache Grünfluoreszenz des Cholesterins, ehe noch darangegangen werden kann, das Präparat richtig auszuwerten. Die darauf folgende, einmal mehr gelbe, das andere Mal mehr gelbbraune "Färbung" kennzeichnet jene Zwischenzellen, die, zumindest überwiegend, nur den inaktiven Vorläufer enthalten.
2. Die Fluoreszenz von Gemischen, bestehend aus Geschlechtshormonen und inaktiven Lipoiden, richtet sich nach dem Mengenverhältnis der beiden Anteile. Überwiegen die Hormone, dann tritt ihre charakteristische Fluoreszenz zutage. Sie sind damit dem Nachweis zugänglich. Überwiegen die inaktiven Lipide, dann findet unter Umständen die Löschung der charakteristischen Fluoreszenz der Hormone so rasch statt, daß vorerst nur eine gröbere Auswertung möglich ist. Das Testosteron des Rattenhodens zeigt ebenso wie die in Öl gelöste kristalline Reinsubstanz eine erst nach 20-30 Sekunden abnehmende deutliche Grünfluoreszenz.

Die im histologischen Präparat enthaltenen Hormone zeigen bei entsprechender Vorbehandlung des histologischen Schnittes die gleichen fluoreszenzmikroskopischen Eigenschaften wie die Modellsubstanzen.

Die BURKLschen Tierversuche brachten folgendes Ergebnis:

1. Beobachtung an zwei Tieren, die wochenlang vom Weibchen getrennt waren:
Die LEYDIGschen Zwischenzellen in den Hoden dieser Tiere geben überall in den Schnitten eine intensive Grünfluoreszenz. Analog der charakteristischen Fluoreszenz von kristallinem Testosteron zeigen auch die Hormone im Hoden nach etwa 15-20 sec eine merkliche Verringerung der Intensität des emittierten Lichtes, was nach längerer Beobachtungszeit immer deutlicher wird. Der fluoreszierende Stoff ist vorwiegend an der Basis der Epithelzellen der Hodenkanälchen in der unmittelbaren Nachbarschaft der Kanälchenwand lokalisiert.
2. Zwei Tiere wurden nach einer mehrere Wochen dauernden Trennung auf einen Tag zum Weibchen gesperrt.
Hier war das Bild anders. Die Menge des fluoreszierenden Hormons ist im allgemeinen mehr oder weniger stark vermindert. In den Kanälchen findet es sich nirgends. Auch der Zeitpunkt der Intensitätsabnahme des Fluoreszenzlichtes tritt häufig früher ein. Nach BURKL spricht diese Tatsache dafür, daß der Gehalt der Zellen an löslichen Vorläufersubstanzen absolut oder relativ vermehrt ist.
3. Zwei Ratten wurden mit je 200 IE Serumgonadotropin behandelt und drei bzw. sechs Stunden nach der Injektion getötet.
Die Hoden dieser Tiere zeigten reichliche Mengen des fluoreszierenden Hormons in den LEYDIGschen Zwischenzellen.
4. Zwei Ratten wurden mit 200 IE Choriongonadotropin behandelt und ebenfalls nach drei bzw. sechs Stunden post injektionem getötet.
Das eine Tier zeigte drei Stunden nach der Injektion nur an wenigen Stellen im Präparat Reste von fluoreszierenden Substanzen in den Zwischenzellen. In den Kanälchen ließ sich auch nicht eine Spur finden. - Das andere Tier, das sechs Stunden nach der Injektion getötet wurde, zeigt hinsichtlich der Menge und Verteilung ein Bild, wie

es bei denjenigen Tieren zu beobachten war, die wochenlang vom Weibchen getrennt waren.

Mit diesen Untersuchungen ist nach BURKL endgültig bewiesen, daß die LEYDIGschen Zwischenzellen das männliche Sexualhormon produzieren.

Die Beobachtungen von BURKL stimmen mit den Ergebnissen von WISLOCKI (1949) überein. Ungesättigte Steroide zeigen eine grüne oder gelbe Autofluoreszenz, wenn sie durch ultraviolettes Licht angestrahlt werden, unter polarisiertem Licht werden sie in den Zellen als doppelbrechende Sphärökristalle sichtbar.

Ihm standen als Untersuchungsmaterial die Hoden von vier VIRGINIA-Hirschen und von zwei JAPAN-Hirschen zur Verfügung. Das Gewebe wurde jeweils im Juni, Oktober und November entnommen, von den JAPAN-Hirschen im Juni und November.

Zum Nachweis steroider Substanzen wurden Stücke aus dem Hoden in 10% neutralem Formalin fixiert. Ungefärbte Gefrierschnitte wurden unter ultraviolettem Licht auf ihre natürliche Fluoreszenz und mit dem Polarisationsmikroskop auf Doppelbrechung untersucht. Andere Schnitte wurden mit Sudan III oder Sudan Schwarz B und mit den SCHIFFschen Plasmalreagens (Plasmalreaktion nach FEULGEN und VOIT) angefärbt. Wiederum andere wurden mit Azeton bei Zimmertemperatur behandelt, ehe die oben beschriebene Präparation durchgeführt wurde.

Eine einzelne Methode allein ist zum Nachweis von Ketosteroiden im Gewebe nach WISLOCKI nicht geeignet, erst durch Kombination zweier oder mehrerer Methoden kann mit größerer Zuverlässigkeit das Gesamtbild charakteristischer Eigenschaften von Ketosteroiden nachgewiesen werden (BENNET, DEMPSEY und WISLOCKI). Die Steroide und mit ihnen andere Lipide sind sudanophil und können mit Sudan gefärbt werden. Auf Grund ihrer Ketogruppe sollen die Ketosteroide Leukofuchsin (SCHIFFsches Reagens) neu anfärben und so eine purpurne Farbe erzeugen können (nach WISLOCKI die "Plasmalreaktion" von FEULGEN und VOIT).

In den interstitiellen Zellen der Hoden im Herbst können im Polarisationsmikroskop zahlreiche doppelbrechende Tropfen wahrgenommen werden. Im ultraviolettem Licht strahlen die interstitiellen Zellen eine gelbe Autofluo-

reszenz aus. Diese Reaktion ist nicht zu beobachten, wenn zuvor der Gefrierschnitt mit Azeton behandelt wurde.

Im Juni, während der sexuell inaktiven Phase, sind die genannten Zellen kleiner und an Zahl verringert, die sudanophilen Tröpfchen haben abgenommen. Die SCHIFFsche Reaktion, die Doppelbrechung und die Autofluoreszenz sind gleichermaßen zurückgegangen.

WISLOCKI zeigt, daß das interstitielle Gewebe nicht nur als Bildungsstätte der Ketosteroide allein zu betrachten sei, sondern daß die jeweilige Menge im Herbst, also zur Brunft, wesentlich größer ist, als während des Zeitraumes geschlechtlicher Inaktivität.

Der Hoden eines VIRGINIA-Hirsches im November zeigt im Basalabschnitt der Tubuli unter ultraviolettem Licht eine Anzahl rötlich-gelber Granula und Tröpfchen. Der gelbe Farbton, der nach WISLOCKI den Lipchromen zuzuschreiben ist, scheint mit den gröberen sudanophilen Tröpfchen in Zusammenhang zu stehen, die in den mit Sudan gefärbten Präparaten zu beobachten waren. Eine geringe Menge ähnlicher rötlich-gelber Tröpfchen war auch im interstitiellen Gewebe zu beobachten. Im Juni nimmt die Reaktion allgemein wieder ab.

III. HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER INTERSTITIELLEN ZELLEN DES HODENS.

Wurde bisher über einen physikalischen Nachweis der Androgene gesprochen, so soll in folgendem über eine histochemische Methode berichtet werden. HANES, MOORE und GALLAGHER, WILHELM und SHWARTZ, WILLIAMS und CUNNINGHAM und zahlreiche andere Autoren sprachen schon die Möglichkeit einer Androgenabsonderung der interstitiellen Zellen aus, auch wenn die Keimzellen fehlen oder zugrunde gegangen sind.

Ein lipoidlösliches Androgen wurde von frischen Bullenhoden durch McGEE abgespalten, DAVID isolierte das Testosteron, RUCICKA und BUTENANDT synthetisierten es. Diese Substanz wurde für ein mögliches Hodenhormon angesehen.

Die Behauptung von MARTINS und ROCHA und McCULLAGH, es gäbe ein wasserlösliches Hormon des Hodens, konnte nicht bewiesen werden. Auch kann noch kein wirklich wasserlösliches Hodenhormon als endgültig dargestellt betrachtet werden.

POLLOCK behandelte das Sektionsmaterial von erwachsenen Katzen, Ratten, Meerschweinchen, Mäusen und Kaninchen mit Phenylhydrazin, eine Technik, die BENNETT an der Nebenniere verwendete und die wertvoll für die Lokalisation von Testosteron erschien, das chemisch den Steroiden in der Niere ähnlich war. Gefrierschnitte von erwachsenen Katzenhoden wurden, gemäß der BENNETTschen Methode, mit Jod und Phenylhydrazin im Acetatspuffer behandelt. Kontrollschnitte wurden in Alkohol, Aceton und Petroläther ausgelaugt oder mit Semicarbaziden behandelt. Die Präparate wurden mit Glyceringelatine oder mit Glycerin eingedeckt.

Die Farbe, hervorgerufen durch das Phenylhydrazin-Reagens kann mit Tageslicht beobachtet werden, abgesehen von einer geringen chromatischen Verzerrung. Diese Beleuchtungsart ist der künstlichen Lichtquelle, so wie sie zuvor verwendet wurde, überlegen (BENNETT). Werden die Schnitte zuerst präpariert, dann ist die Farbe des Phenylhydrazinkomplexes als weitaus blasser zu erkennen. Blieben die eingedeckten Präparate über Nacht stehen, dann oxydierte der Komplex zu einem viel dunklerem Gelb.

Hinsichtlich der Möglichkeit, daß eine Formaldehydfixierung mit dem Phenylhydrazin eine falsche Farbe ergibt, wenn die Aldehyde nicht vollständig herausgewaschen sind, wurde von POLLOCK frisches, unfixiertes Material in eine Mischung von Trichloressigsäure, Essigsäure und Quecksilberchlorid gebracht und dieses mit formolfixierten Schnitten verglichen. Es ergab sich kein Unterschied. Die Fixierungstechnik mit Formal wurde daher als ausreichend angesehen. Eine Fixierung mit 5%iger Essigsäure war im Hinblick auf eine Verzerrung und ein Anschwellen kollagener Fasern unbefriedigend.

Die so mit der Phenylhydrazintechnik vorbehandelten Schnitte ergaben eine gelbe Farbe bei allen untersuchten Tieren in den interstitiellen Zellen des Hodens, welche sonst in keinem anderen Abschnitt des Hodens beobachtet werden konnte. Nach Extraktion durch Aceton und Alkohol wurde die Farbentwicklung verhindert. Ebenso wurde dieses Bild durch Behandlung mit Semicarbaziden rückgängig gemacht.

Die Behandlung mit Digitonin rief eine Zunahme der doppelbrechenden Kristalle in den LEYDIG-Zellen hervor, die Farbentwicklung wurde aber nach der Ausbildung der Digitonide nicht herabgesetzt. Die Behandlung mit Aceton und Alkohol führte zur Zurückbildung der normalen doppelbrechenden Kristalle und verhinderte vollständig die Bildung von Digitoniden. Diese Zunahme betrachtet POLLOCK als Zeichen steroider Komplexe in den Zellen, wie Cholesterin oder einiger ähnlicher Substanzen mit einer trans-3-OH-Gruppe.

Komplexe mit den chemischen Eigenschaften von Testosteron sind ausschließlich nur auf die interstitiellen Zellen beschränkt und sind nirgendwo anders im Hoden zu finden. Dieses liefert nach POLLOCK den histochemischen Beweis, daß die interstitiellen Zellen die Quelle der Androgene des Hodens sind.

Methoden zur histochemischen Darstellung von Ketosteroiden in verschiedenen endokrinen Drüsen, wie Nebennierenrinde, Ovar, Hoden und Placenta wurden 1949 von ASHBEL und SELIGMAN sowie im gleichen Jahr von SELIGMAN, FRIEDMAN und HERZ beschrieben. Dabei werden histochemisch Karbonylgruppen nachgewiesen, die sich in charakteristischer Stellung am Steroidgerüst finden. Die Methode ist aber insofern unspezifisch, als ver-

schiedene aktive Carbonylgruppen von Lipoiden in gleicher Weise dargestellt werden, so daß nicht sicher entschieden werden kann, ob in einem Gewebe, dessen Ketosteroidgehalt bekannt ist, es auch diese letzteren sind, die für die Reaktion verantwortlich gemacht werden können. Nachfolgend kurz die Technik von ASHBEL und SELIGMAN zum Nachweis von Ketosteroiden:

1. Fixierung von frischem Gewebe in 10%igem neutralisiertem Formol. Die Dauer der Fixationszeit hat keinen Einfluß auf den Ausfall der Reaktion.
2. Auswaschen des Formalins in fließendem Wasser für 24 Stunden oder Herstellen von Gefrierschnitten (15-30) in mehrmals gewechseltem Wasser für einige Stunden waschen.
3. Einbringen der Schnitte in eine 0,1%ige Lösung der 2-hydroxy-3-Naphthanylsäure 1-3 Stunden.
Die Lösung wird hergestellt durch Auflösen des feinen Puders in 50%igem Äthylalkohol, der 5% Eisessig enthält. Durch Erwärmen auf 50-60° C und Schütteln gelingt die Lösung leicht.
4. Auswaschen der Schnitte in mehrmals gewechseltem 50%igem Äthylalkohol 2 Stunden, anschließend auswaschen in mehrmals gewechseltem Wasser ebenfalls 2 Stunden. (Die Waschzeiten können auch verkürzt werden.)
5. Einbringen der Schnitte in folgende Lösung:
Gleiche Teile von Alkohol abs.
1/15 M Phosphat- oder Azetatpuffer, pH 7,2-7,5.
Zu 50 ccm dieser Lösung, die Schnitte bei Zimmertemperatur enthält, bringt man 50 mg des tetraazotierten Diorthoanisidins. Man löst mit wenigen ccm Aqua dest. die 50 mg auf und rührt die Lösung vorsichtig in den gepufferten Alkohol ein. Die Entwicklung der blauen Farbe im Gewebe erreicht in 0,5-2 Minuten ihre höchste Intensität, während die schwach gelbliche Lösung langsam dunkelt.
6. Übertragen der Schnitte in Wasser für 5-15 Minuten, Aufziehen auf einen Objektträger und Eindecken mit Glyceringelatine.

Von jedem Block können einige Schnitte mit Sudan zum Fettnachweis gefärbt werden.

Um zwischen östrogenen und androgenen Ketosteroiden unterscheiden zu können, wird der Phenol-Charakter des aromatischen Ringes A mit seiner OH-Gruppe am C₃ ausgenützt. Es wird aus dem Gewebe durch Inkubation in alkalische Lösung bei einem pH-Wert von 11 diese Gruppe eliminiert, was schon früher als Nachweis von Ketosteroiden diente. Die Präparate werden für eine Zeitdauer von 24 Stunden in 50 ccm 5%iger Kaliumkarbonatlösung oder 0,5%iger Trinatriumphosphatlösung gelegt. Die Kontrollschnitte werden

für die gleiche Zeit in destilliertes Wasser eingebracht. Die beiden verschieden vorbehandelten Schnitte werden gemeinsam einige Stunden in destilliertem Wasser gewaschen und nach der oben angegebenen Methodik für Carbonylgruppen gefärbt.

1951 untersuchten SELIGMAN und ASHBEL normales und neoplastisches Nervengewebe, ferner Rindentumoren der Nebenniere, vergesellschaftet mit frühreifer Entwicklung und Virilismus. In einer weiteren Arbeit wird von ASHBEL, COHEN und SELIGMAN über die Lokalisation von Ketosteroiden im Hoden verschiedener Tiere unter normalen und pathologischen Bedingungen berichtet. Dazu gehören eine kurze Reihe von LEYDIG- und SERTOLI-Zelltumoren des Hundes und einige Seminome vom Menschen und vom Hund sowie drei experimentell erzeugte Tumoren interstitieller Zellen der Maus.

Die Geschwülste interstitieller Zellen enthalten große Mengen an Lipoid und Ketosteroiden, die im Zytoplasma der Tumorzellen als Tröpfchen oder als Granula verschiedener Größe verteilt sind. Die SERTOLI-Zelltumoren enthalten weniger Ketosteroide, sie sind auch mehr auffallend fleckförmig verteilt, so daß größere Gebiete ungefärbt bleiben. Diese unterschiedliche Verteilung von Ketosteroiden darf nicht als Unterscheidungsmerkmal zwischen LEYDIG- und SERTOLI-Zelltumoren aufgefaßt werden.

Um eine Unterscheidung androgener und oestrogenen Ketosteroide durchzuführen, wird die Alkalilöslichkeit der letzteren herangezogen. Die Androgene werden von der Alkali-Behandlung nicht berührt.

In drei LEYDIG-Zelltumoren der Maus wurden die Ketosteroide durch alkalischen Auszug nicht angegriffen. Bei drei SERTOLI-Zelltumoren kam es jedoch zu einer völlig verhinderten Reaktion. Wurde aber die Extraktion bei einem niedrigeren pH-Wert (Kaliumbicarbonat) durchgeführt, zeigte die Reaktion ein positives Ergebnis. Damit dürfte der Phenolcharakter bewiesen sein.

Diese Beobachtung stützt die Hypothese, daß eine Reaktion für lipoidale Carbonylgruppen auch Ketosteroide in diesem Gewebe darstellen kann.

In Tumoren, die beide Zellformen zu enthalten scheinen, ist diese Durchführung weniger zuverlässig, da es schwierig ist, eine unvollständige Entfernung von Ketosteroiden in dem Gewebe mit Sicherheit zu erkennen.

Die interstitiellen Zellen von vier normalen Hunden wurden durch einen alkalischen Auszug nicht angegriffen. In zwei anderen Fällen kam es zu einer leichten Bleichung der SERTOLI-Zellen. Der gleiche Vorgang konnte in interstitiellen Zellen von menschlichen Hoden, von Schweinen und einem kryptorchiden Hund beobachtet werden. Die Reaktion war nicht so ausgeprägt wie bei einigen SERTOLI-Zelltumoren. Es scheinen aber einige Östrogene in interstitiellen Zellen vorzukommen. Die Reaktion für Ketosteroide in den SERTOLI-Zellen scheint aber mehr den Östrogenen zuzukommen (ASHBEL, COHEN und SELIGMAN).

ASHBEL, COHEN und SELIGMAN kommen zu folgendem Ergebnis: Das Keimepithel aller untersuchten Tierarten und Seminome, die ihren Ursprung vom germinativen Epithel haben, enthalten weder Lipoid, noch Ketosteroide. Ebenso die interstitiellen Zellen und SERTOLI Zellen menschlicher Embryonen und Kinder unter 10 Jahren.

Zur Untersuchung gelangten die Hoden von verschiedenen Tieren (Frösche, Haushähne, Mäuse, Ratten, Kaninchen, Schweine, Hunde, Pferde und Ziege).

Die interstitiellen Zellen der meisten untersuchten Tiere weisen unterschiedliche Mengen an Ketosteroiden auf. Bei der Maus, Ratte, Kaninchen, Pferd und Geiß können nur in den interstitiellen Zellen Ketosteroide und Lipoid nachgewiesen werden, jedoch nicht in den SERTOLI-Zellen.

Bei elf Hunden enthalten die LEYDIG-Zellen Ketosteroide und Lipoid in großen Mengen, die SERTOLI-Zellen dagegen zeigen nur bei zwei Hunden geringe Mengen dieser Substanzen.

Bei SERTOLI-Zelltumoren des Hundes war der Betrag an Ketosteroiden unterschiedlich und gewöhnlich noch geringer als in den Tumoren der interstitiellen Zellen.

Beim erwachsenen Menschen konnten sowohl Lipide als auch Ketosteroide in den LEYDIG- und SERTOLI-Zellen nachgewiesen werden. An Patientengut standen Neugeborene und Fälle bis zum 85. Lebensjahr hinauf zur Verfügung. Das Material wurde teils chirurgisch, teils durch Autopsie gewonnen.

Die spermatogenetischen Elemente des Hodens zeigen weder Lipoid noch Ketosteroide. Bei 12 und 18 Wochen alten menschlichen Embryonen ist von

diesen Substanzen überhaupt nichts gefunden worden.

Die interstitiellen Zellen von Erwachsenen enthalten unterschiedliche Mengen von Ketosteroiden. Das größte Vorkommen kann im Alter zwischen 40-60 Jahren beobachtet werden. Bei höherem Alter nimmt der Anteil ab. Die interstitiellen Zellen von Erwachsenen zeigen beachtliche Ansammlungen sudanophilen Materials, auch wenn wenig oder gar keine Ketosteroide nachzuweisen waren.

Bei sechs menschlichen Seminomen konnten weder Lipotide noch Ketosteroide nachgewiesen werden.

Bei den drei experimentell erzeugten LEYDIG-Zelltumoren der Maus sind Ketosteroide und Lipotide gefunden worden. Einer dieser Tumoren war ein Transplantat in der 35. Generation.

Die Arbeit von ASHBEL, COHEN und SELIGMAN soll den Nachweis erbringen, daß die Ketosteroide

1. sowohl in den LEYDIG-Zellen, als auch in einigen SERTOLI-Zellen vorkommen,
2. in den interstitiellen Zellen zum größten Teil alkalisch unlöslich (Androgene), in den SERTOLI-Zellen alkalisch löslich (Östrogene) sind, daß
3. in den Tumoren, die von diesen Zellen ihren Ursprung haben, die der jeweiligen Zellform adäquate Ketosteroidkomponente vorkommt, und daß
4. die interstitiellen Zellen in einigen Fällen geringe Mengen von Östrogenen enthalten können.

IV. VITAMIN-C-UNTERSUCHUNGEN.

Solche wurden an den Hoden von GIROUD und LEBLOND, TONUTTI und FALLER sowie von WALLRAFF durchgeführt. Wir stellen in der Besprechung die Ergebnisse von WALLRAFF voran, zumal sie auch Befunde an den ableitenden Samenwegen einschließen.

Als Untersuchungsmaterial standen ihm 14 gesunde Männer, die hingerichtet wurden, im Alter von 20-40 Jahren zur Verfügung.

Zunächst die Beobachtungen am Hoden:

Die Zwischenzellen zeigen regelmäßig das meiste Vitamin C. Das Keimepithel hingegen ist nahezu vitamin-C-frei. Die Zwischenzellen sind stark mit Vitamin C beladen, das durch die saure Silbernitratlösung, die zu metallischem Silber reduziert wird, augenscheinlich wird. (Verfahren nach GIROUD und LEBLOND). Dieses liegt in Gestalt schwarzer Klumpen in der GOLGI-Zone des Zelleibes oder in Form von feinen und groben Silberkörnern im übrigen Protoplasma.

Von den samenbildenden Zellen der Hodenkanälchen enthalten nur einige sehr wenige Silberkörnchen.

Ebenfalls wie die Keimzellen sind die SERTOLIschen Stützzellen arm an Vitamin C.

Dieses Vitamin-C-Bild des menschlichen Hodens wurde von TONUTTI als relative "Ruhephase" bezeichnet und soll sich infolge seelischer Erregung vor der Hinrichtung und hormonalen Einflusses, z. B. Insulinzufuhr, schlagartig umkehren: das Keimepithel ist jetzt massenhaft mit Vitamin C beladen, die Zwischenzellen dagegen fast vitamin-C-frei. WALLRAFF hat einen derartigen Befund nicht erheben können und nimmt an, daß es sich hierbei um einen Ausnahmefall gehandelt hat. Die von GIROUD und LEBLOND, TONUTTI und FALLER an tierischen Hoden erhobenen Befunde stimmen mit denen von WALLRAFF überein.

Die Untersuchungen am Nebenhoden gaben folgendes Ergebnis:

Das niedrig- bis hochzylindrische Epithel der Ductuli efferentes des menschlichen Nebenhodens ist arm an histochemisch faßbarem Vitamin C.

Zahlreiche, mitunter sogar die meisten Epithelzellen der Ductuli efferentes sind mit gelbbraunen Pigmentkörnern mehr oder minder stark beladen. Es hat sich gezeigt, daß das Vitamin C in enger Beziehung zu diesem Pigment steht. Am stärksten ist es in unmittelbarer Nähe des Kernes zu finden, offensichtlich im GOLGI-Feld der Zelle. An der gleichen Stelle findet sich auch das meiste Vitamin C. Von Pigment getrenntes Vitamin C kommt aber in den Epithelzellen der Ductuli efferentes so gut wie garnicht vor. Der Kanälcheninhalt war stets frei von Vitamin C.

Das hohe zweireihige Zylinderepithel des Nebenhodenganges besitzt durchweg einen höheren Vitamin-C-Gehalt als die Ductuli efferentes, der aber innerhalb einiger Gangstrecken verschieden hoch sein kann. Den größten Vitamin-C-Reichtum fand WALLRAFF in den Basalzellen, in der Höhe von Epithelfalten und in den gangeinwärts gerichteten Wandzellen von Epithelzysten des Nebenhodenganges.

Wurde bis jetzt das Verhalten der Ductuli efferentes und des Nebenhodenganges im Nebenhodenkopf und -körper zum Vitamin C untersucht, so soll jetzt der Nebenhodenschwanz, der eigentliche Samenspeicher, seiner Betrachtung unterzogen werden.

Eingehende Untersuchungen WALLRAFFs haben ergeben, daß dieser wesentlich ärmer an Vitamin C ist als der Nebenhodenkopf und der -körper im besonderen. Überall fand sich nur an einzelnen Stellen spärlich Vitamin C im Epithel des Nebenhodenganges. Selten waren es einzelne oder mehrere Zellen, so auch die Basalzellen, deren GOLGI-Feld mit Vitamin C stärker beladen war. Nur beim Eingangsabschnitt, der in seinem Aufbau dem Nebenhodenkörper noch sehr ähnelt, waren diese Unterschiede nicht immer so deutlich ausgeprägt. In keinem Falle und an keiner Stelle hatten die zahlreichen und hohen Schleimhautfalten des Mittel- und Ausgangsabschnittes den so häufig im Nebenhodenkörper beobachteten Vitamin-C-Reichtum aufzuweisen. Das meiste Epithel war wie das übrige frei von Vitamin C.

Der Ausgangsabschnitt des Nebenhodenschwanzes bildet den Übergang vom Nebenhoden zum Samenleiter. Sein Epithel ist so gut wie völlig vitaminlos. Das Epithel der Ampulle verhält sich nicht viel anders zur Vitamin-C-Reaktion als das des Samenleiters. Immerhin wurden auf jedem Schnitt einzelne Epithelzellen und kleine Epithelstrecken gefunden, die zwi-

schen Kernen und freier Oberfläche zahlreiche schwarze Körnchen im Plasma eingelagert hatten. Verglichen mit dem Nebenhodenschwanz und dem Samenleiter erscheinen die Bläschendrüsen beinahe vitamin-C-reich. Wesentlicher Träger ist auch bei ihnen das Epithel. WALLRAFF trifft folgende Unterscheidung am Epithel der Bläschendrüsen:

1. Zellen ohne Pigment und ohne Vitamin C;
2. Zellen ohne Pigment, mit spärlichen im Cytoplasma verstreut oder im GOLGI-Feld liegenden Silberkörnchen;
3. Zellen mit Pigment, aber ohne Vitamin C;
4. Zellen mit viel Pigment und viel Vitamin C.

Die vitamin-C-reichsten Zellen waren stets die pigmentreichsten. Andererseits zeigen diese Befunde aber auch, daß die Silberreaktion trotz Anwesenheit des Pigments in den Zellen negativ ausfallen kann.

Dem in den Ductuli efferentes spärlich, in den Bläschendrüsen reichlicher nachgewiesenen Vitamin C scheint eine besondere Bedeutung wegen seiner engen Beziehung zum Pigment zuzukommen.

LEOPOLD, der an pigmenthaltigen Nervenzellen eine ähnliche Beobachtung machte, hat sich mit der Frage beschäftigt, ob die Silbernitratreduktion in diesem Falle durch Vitamin C oder Pigment erfolgte. Außer Vitamin C vermag nämlich, worauf GIROUD und LEBLOND, BOURNE und TONUTTI hingewiesen haben, nur noch ein Pigment der Melaninreihe Silbernitrat zu reduzieren. Hauptsächlich aus diesem Grund bezweifelt LEOPOLD die Echtheit des Vitamin-C-Nachweises in den Nervenzellen.

Auch LIPP weist auf die Problematik dieser spezifischen Silberreaktion hin. Denn neben den Pigmenten sind es auch die Lipofuscine, die sich auf Grund reduzierender Gruppen schwärzen. Es ist jedoch noch zu erwägen, ob das Silber nicht durch Ascorbinsäure reduziert und erst sekundär an der Oberfläche der Pigmentkörnchen niedergeschlagen wird (LIPP).

Für die Abnutzungs- oder Lipoidpigmente der Ductuli efferentes und der Bläschendrüsen ist eine Verwandtschaft mit den Melaninen nicht erwiesen. Daß die schwarzen Silbergranula offensichtlich regelmäßig an der Oberfläche der groben Pigmentkörner haften, führt WALLRAFF gleichfalls zu der Überlegung, daß jene durch Ascorbinsäure reduziert wurden. Sollte diese Auf-

fassung richtig sein, so würde diesem Abnutzungspigment eine bedeutsame Stoffwechselaufgabe zufallen. Im Hinblick darauf scheint es WALLRAFF bemerkenswert, daß das Pigment mit Vorliebe in Kernnähe, offenbar im Bereich des GOLGI-Feldes liegt, also in dem für den Ablauf des Zellstoffwechsels so wichtigen Teil des Zellplasmas.

TONUTTI reduziert nicht mit Silbernitrat, sondern führt die Reaktion mit Goldchlorid durch. Er teilt seine Beobachtungen in eine "Schock-" und in eine "Ruhephase" ein. Es finden sich leider keine genauen Angaben, welches Untersuchungsmaterial und welche Methodik angewendet wurde.

TONUTTI findet von anderen Untersuchern bestätigt, daß z. B. das Mark der Nebennieren so gut wie frei von Vitamin C ist. Jedoch nach Bekanntgabe des Hinrichtungstermins tritt ein psychischer Aufruhr des Delinquenten ein, was zu einer erhöhten Adrenalinausschüttung führt; die Arbeitsleistung der Nebennierenmarkszellen ist erhöht und führt zu einer ungeheuren Aufladung jener Zellelemente mit Vitamin C. Die gleichen Verhältnisse finden sich an der Schilddrüse. Dieses Organ und die Epithelkörperchen sind als histochemisch frei von Vitamin C beschrieben worden. TONUTTI zeigt nun an histologischen Bildern ein Aufladen der Follikelepithelien mit Vitamin C. Die Ablagerung findet im GOLGI-Apparat statt.

Auch die Keimdrüse gewährt nach TONUTTI aufschlußreichen Einblick. Gewöhnlich sind während der relativen Ruhephase die Hodenzwischenzellen außerordentlich vitamin-C-reich, die generativen Zellen dagegen zeigen spärliche Granula. Dieses Bild wechselt schlagartig, genauso wie in der Nebennierenrinde, unter geänderten hormonalen Bedingungen, d. h. unter funktionellem Anreiz. Das generative Epithel zeigt massenhaft Vitamin C, die Zwischenzellen sind fast frei davon.

TONUTTI weist doch ausdrücklich darauf hin, daß das Vitamin C mit Hormonen nichts zu tun hat. Die eingetretenen Verschiebungen an den Nebennierenmarkszellen sind wohl als Folge primärer Adrenalinausschüttung zu deuten, jedoch nicht etwa als Ausdruck eines "spezifischen" Zusammenhanges zwischen Adrenalin und Vitamin C.

Histochemische Untersuchungen des Vitamin-C-Stoffwechsels der Zelle ergeben eine Vitamin-C-Aufnahme über den GOLGI-Apparat (TONUTTI). Am GOLGI-Apparat wird es reduziert und alsdann, an Material des GOLGI-

Apparates gebunden, in das Plasma abgestoßen. Dieser Vorgang läßt sich an Beispielen hochaktiver Zellen zeigen, wie z. B. an Abschnitten eines Nierenhauptstückes, Hodenzwischenzellen, histozytären Elementen der Tunica Propria des Dünndarms und an Leberzellen. Ein ganz ähnlicher Vorgang spielt sich, wie NASSONOW zeigte, an der Zelle bei vitaler Einverleibung saurer kolloidaler Farbstoffe ab (Trypanblau).

Es ist bekannt (TONUTTI), daß sich in jeder normalen Hodenzwischenzelle Vitamin-C-Granula finden. Läßt man beim normalen Tier Trypanblau speichern, so erfolgt die Ablagerung an die bereits bestehende Vitamin-C-Granula. Beide Substanzen benützen die gleiche Trägersubstanz, gleichgültig, welcher Stoff zuerst in der Zelle vorhanden ist. Das gilt für alle Körperzellen, die einer Beladung mit Vitamin C und mit sauren Farbstoffen fähig sind. Ist die Zelle zur Granulabildung nicht in der Lage, so nimmt sie kein Vitamin C auf. Die Bindung des Vitamin C an ein Plasmasubstrat wird als eine Schutzmaßnahme des Plasmas gegen ein unvermitteltes, plötzliches Wirksamwerden des Gesamt-Vitamin-C-Bestandes der Zelle aufgefaßt (TONUTTI).

V. PLASMALUNTERSUCHUNGEN.

Nach Beobachtungen von FEULGEN und VOIT wird bei Einwirkung von fuchsinschwefliger Säure (SCHIFFsches Reagens) auf Gefrierschnitte die Nuclearfärbung durch eine im Zytoplasma auftretende starke Rotfärbung überdeckt. Diese Reaktion ist durch ein lipoides Aldehyd bedingt, das FEULGEN und VOIT als Plasmal bezeichnen.

Untersuchungen der männlichen Geschlechtsorgane mit Hilfe der Plasmalreaktion wurden erstmals von WALLRAFF durchgeführt. Die im umgebenden Bindegewebe der Hodenkanälchen liegenden Zwischenzellnester sind nach seinen Untersuchungen plasmalreich und heben sich daher von ihrer plasmalärmeren Umgebung deutlich ab.

An den Hodenkanälchen fällt die Plasmalreaktion ganz schwach aus, indem das Keimepithel bald in einem zarten rötlichvioletten, bald graubläulichen Farbton erscheint, vielerorts aber auch farblos ist. Bei manchen Hodenkanälchen besitzen Spermatogonien und Spermatozyten einen höheren Plasmalgehalt und bilden dann der Tunica propria entlang einen etwas kräftigeren rötlichvioletten Plasmalstreifen. Die darüberliegenden Keimzellen sind nicht selten völlig plasmalfrei. Der freie Inhalt der Samenkanälchen zeigt keine Plasmalreaktion.

Das Epithel des Nebenhodenganges ist verhältnismäßig plasmalreich, die Tunica propria und das übrige Bindegewebe hingegen ist ohne Befund. Häufig findet man im Epithel des Nebenhodenganges zahlreiche violette Plasmalschollen oder -brocken; oft enthalten die Basalzellen auch nur einen "Plasmalbrocken".

Das Plasmalbild vom Eingangsabschnitt des Nebenhodenschwanzes zeigt ähnlich wie das des Nebenhodenkopfes eine starke Reaktion des Epithels. Die Muskelzellen dieses Abschnittes geben eine schwache Plasmal-Reaktion.

Im Mittelabschnitt ist der Befund des Epithels nicht minder stark als im Eingangsabschnitt. Der bedeutend stärker gewordene Muskelmantel tritt mit seinem Plasmal recht deutlich hervor.

Im Ausgangsabschnitt des Nebenhodenschwanzes bleibt das Plasmalbild von Epithel und Muskelmantel, der an Stärke noch zugenommen hat, unver-

ändert. Von den drei Teilen des Nebenhodens hat der Schwanzteil in allen Fällen den höchsten Plasmalgehalt aufzuweisen.

Das Plasmalbild des Samenleiters und der Ampulle stimmt mit dem des Nebenhodenganges im Ausgangsabschnitt des Schwanzes völlig überein. Die Reaktion der Prostata ist nicht einheitlich. Das Muskelgewebe färbt sich gleichmäßig, das Epithel schwankt zwischen starker und schwacher Reaktion. Im Ganzen gesehen spricht WALLRAFF von einem mittelstarken Plasmalgehalt der Prostata.

VI. CHOLESTERIN.

Die ersten Untersuchungen doppelbrechender Substanzen im menschlichen Hoden von KARWICKA gehen auf das Jahr 1911 zurück. KAWAMURA bestätigt zur gleichen Zeit die Angaben und folgerte durch Vergleichsbeobachtungen an der Prostata, daß es sich nur um Cholesterin handeln kann.

Zytochemisch wurde das Cholesterin von LONG und ENGLE an Biopsiematerial von 22-23 Jahr alten Patienten durch die SCHULTZsche Modifikation des LIPSCHÜTZschen Oxycholesterintestes nachgewiesen. Die Anwesenheit des Cholesterins zeigt sich durch seine blaugüne Farbtönung.

MANCINI, NOLAZCO und DE LA BALZE beobachteten eine negative Reaktion für Cholesterin und Cholesterinester von Spermatogonien bis zu den Spermatozyten im Keimepithel normaler menschlicher Hoden. Die SERTOLI-Zellen waren ebenfalls negativ. Der Nachweis erfolgte durch die Jodreaktion und durch das Verfahren von BAUER und HOTCHKISS (1948) in der Modifikation von McMANUS. Die Probe wurde bei einer Dauer von 3 Stunden bei 37°C durchgeführt. Das durch Biopsie gewonnene Material stammte von 16 Freiwilligen im Alter zwischen 26 und 70 Jahren. PERLMAN berichtet von Cholesterinestern im Keimepithel der Ratte und MONTAGNA und HAMILTON (1951) für gleiches den menschlichen Hoden. MANCINI, NOLAZCO und DE LA BALZE jedoch waren nicht in der Lage, Cholesterin oder Cholesterinester im Keimepithel normalen menschlichen Untersuchungsmaterials nachzuweisen.

LONG und ENGLE wiesen Cholesterin in den Lipoidtröpfchen der interstitiellen Zellen nach, das wahrscheinlich in den Tropfen mit anderen Lipoidsubstanzen vermischt ist. Ihre Abschätzung interstitieller Sudanophilie zum Cholesterin war diesem direkt proportional. Wenn die interstitiellen Zellen eine große Anzahl von Lipoidtröpfchen enthalten, war Cholesterin in beachtenswerten Mengen zu beobachten. Umgekehrt waren geringe Beträge sichtbaren Cholesterins bei gleichem Patientengut von kärglicher Sudanophilie begleitet

Nicht immer muß die Cholesterinbestimmung positiv sein, sie kann auch negativ ausfallen. LONG und ENGLE vertreten die Ansicht, daß dieser negative Befund im normalen Hoden zu Lebzeiten eine rapide Umwandlung der

Vorstufe Cholesterin in Steroidhormonen anzeigt. Diese Reaktion finde derartig schnell statt, daß in den Schnitten solcher Hoden die zytochemische Sichtbarmachung der Vorstufe Cholesterin negativ sei. Diese Hypothese wird durch experimentelle Arbeiten an Tieren erhärtet. Eine Anzahl von

Untersuchern des Ovars (CLAESSON und HILLDARP, DANE und BARKER, LEVIN),

Corpus luteum (EVERETT)

und der Nebenniere (LEVIN, SAGERS)

haben von einer Beziehung zwischen hoher sekretorischer Aktivität dieser Drüsen und dem Fehlen von Cholesterin berichtet und haben dieses Fehlen auf Grund seiner rapiden Umwandlung in Steroidhormone während der hohen sekretorischen Aktivität erklärt.

Es sei daran erinnert, daß die SCHULTZsche Methode für geringe Beträge Cholesterin nicht genügend empfindlich ist.

LONG und ENGLE konnten kein endgültiges Cholesterin in den Tubuluszellen wahrnehmen. Diese Beobachtung wurde von McENERY und NELSON für die menschlichen Tubuli seminiferi bestätigt.

VII. GLYCOGEN.

Das Kohlenhydrat Glycogen ist in demjenigen Hodenmaterial nachzuweisen, das mit der Periodsauren-Leukofuchsin-Methode von McMANUS behandelt wird. Die Gegenwart von Glycogen in den SERTOLI-Zellen (ARZAC, LONG und ENGLE), in den Spermatogonien und in den frühen Spermatozyten I. Ordnung wurde für menschliche Hoden von ELFTMAN, MONTAGNA und HAMILTON, MANCINI, NOLAZCO und DE LA BALZE berichtet.

Glycogen erscheint in abgesonderten Tröpfchen. Im Hodengewebe von infertilen Patienten war das Glycogen in entschieden geringerer Menge in den Zellen fibröser Tubuli vorhanden, als in denjenigen mit normalen Kapselfen. Dieser verminderte Betrag ist vermutlich ein Ausdruck ihrer gut bekannten Abnahme zellulärer Aktivität (LONG und ENGLE). Ein ähnliches Anzeichen dieser Abnahme ist mit der Anhäufung von Ablagerungslipoid in den SERTOLI-Zellen normaler älterer Männer und bei jungen infertilen Patienten bewiesen.

Glycogen war nicht in den interstitiellen Zellen infertiler Fälle anwesend (LONG und ENGLE). Es wurden Tropfen einer Substanz in den interstitiellen Zellen dieser infertilen Fälle beobachtet, die durch diastatischen Abbau nicht beseitigt wurden. Eine weitere Unterscheidungsbestimmung wurde von LONG und ENGLE an diesen Geweben nicht gemacht.

Bemerkenswert wäre noch eine Beobachtung von DE LA BALZE, MANCINI, BUR und IRAZU. Nach Östrogen therapie bei Prostatacarcinompatienten bemerkten sie ein Anwachsen von "Reservematerial" in einem noch zunächst untaktem Keimepithel. Sie verstanden darunter hauptsächlich Lipoide und Glycogen, die beide vermehrt nachzuweisen waren.

WISLOCKI untersuchte 1949 vier Virginiahirsche und zwei Japanhirsche sowohl im Herbst, also zur Brunftzeit, als auch im Juni, der Zeit der sexuell inaktiven Phase. Die vermuteten jahreszeitlichen Veränderungen in den Hoden wurden bestätigt. Die interstitiellen Zellen zeigen zur Junizeit im Hoden kein Glycogen. Ein anderes Verhältnis war in den Kanälchenlichtungen zu beobachten, in denen das Glycogen oft nachzuweisen war, ganz im Gegensatz zum aktiven Hoden, wo es nur in einzelnen SERTOLI-Zellen spär-

lich angetroffen wurde. Die Acroblasten und Acrosomen der Spermatiden, ebenso der Kopf der Spermatozoen wurden rot durch die periodsaure SCHIFFsche Methode angefärbt. Diese Reaktion wurde durch Speichelkontrolle nicht verhindert.

Zur Anwendung kam die Färbemethode nach BAUER-FEULGEN und mit Periodsäure-SCHIFF-Reagens an entparaffinierten Schnitten. Kontrollschnitte wurden 30 Minuten lang bei Raumtemperatur dem Speichel ausgesetzt ehe sie gefärbt wurden. Die Periodsäure-SCHIFFsche Methode wurde nach den Anweisungen von McMANUS durchgeführt.

VIII. LIPASE (Esterase).

LONG und ENGLE verwendeten zur Darstellung des Enzyms Lipase die Methode nach GOMORI. In allen untersuchten Fällen erschien das Ferment in einigen interstitiellen Zellen in charakteristischer Anordnung einschließlich des operativ gewonnenen Hodenmaterials einer älteren Altersgruppe. Es war sowohl in dem fibroblastischen Zelltyp als auch in den endgültigen LEYDIG-Zellen zu finden, aber nur einige der interstitiellen Zellen gaben bei jedem untersuchten Fall eine Reaktion. Diese Tatsache könnte eher einem Irrtum bei der Fixation zuzuschreiben sein, als einer endogen bedingten Abwesenheit des Enzyms in denjenigen interstitiellen Zellen, die eine negative Reaktion gaben. Die Gegenwart dieses Ferments zeigt einen aktiven Lipoidstoffwechsel an. Diejenigen interstitiellen Zellen, in denen es angetroffen wird, können mutmaßlich als normal angesehen werden (LONG und ENGLE).

IX. DURCH ÖSTROGENE AN ERWACHSENEN MENSCHLICHEN HODEN HERVORGERUFENE MORPHOLOGISCHE UND HISTOCHEMISCHE VERÄNDERUNGEN.

DE LA BALZE, MANCINI, BUR und IRAZU führten an menschlichem Hodenbiopsiematerial von Prostata-Patienten, die mit Östrogenen behandelt worden waren, Untersuchungen durch. Dabei beobachteten sie schwere Schädigungen an den Hoden. Atrophische Veränderungen, nach wenigen Monaten der Behandlung eingetreten, berichten auch NELSON, HOWARD, SIMMONS und ALBRIGHT, LYNCH und SCOTT sowie CHARNY. Entsprechend der Therapiedauer werden drei Schädigungsgrade von DE LA BALZE und Mitarbeitern unterschieden. Die Patienten bekamen Stilböstrol oral in täglichen Gaben von 5-50 mg. Ein Patient erhielt über 30 Tage lang täglich 50 mg.

Die einzelnen Schädigungsgrade in kurzer, schematischer Beschreibung:

Schädigung 1. Grades (Behandlungsdauer unter 30 Tagen):

- a. Tubulusinhalt: Dissotiation und Desquamationen des Keimepithels, Hypospermatogenese mäßigen Grades, Gigantische Spermatogonien, Vakuolisierte Spermatozyten. Allgemeine Fette im Keimepithel vermehrt, ebenso Glykogen. Abnahme der alkalischen Phosphatase der Kerne und der metachromatischen Substanz des Plasmas des germinativen Epithels. Vitamin C und Cholesterin negativ.
- b. Tubuluswand: Basalmembran dünner als normal (Färbung: Trichromazocarmin, Technik nach McMANUS). Tunica propria mit leichter fibrillärer Verdickung (Trichrom- und H. E. -Färbung). Die Silberimprägnation zeigt eine Verdickung der Reticulumfasern. Die elastischen Fasern erscheinen zahlenmäßig vermindert, dünner und verkürzt. Die Fibroblasten der Tunica propria sind vermehrt, mit unreifem Aussehen. Die Fibrocyten und Fibroblasten haben in den Kernen die alkalische Phosphatase festgehalten.
- c. Intertubuläres Bindegewebe: Unregelmäßige Gruppen oder Nester normaler LEYDIG-Zellen; einige zeigen Umwandlung in "Fettzellen". Manchmal Zeichen von Kernpyknose

und Kernverlagerung, Schrumpfung der Kernmembran, Auflösung des Plasmas. Andere LEYDIG-Zellen zeigen eine Verteilung in Zellgruppen und Umwandlung einzelner Zellen in eine fusiforme Gestalt. Die LEYDIG-Zellen scheinen durch eine Reihe von Übergangsformen den Fibroblasten morphologisch ähnlich zu werden.

Nach Auflösung der normalen LEYDIG-Zellhaufen wird das reticuläre Netzwerk dünner, die Fasern liegen weniger dicht beieinander. In einigen Fällen zeigt die Intima der Gefäße eine stärkere Hyalinisierung.

Schädigung 2. Grades

(Behandlungsdauer über 30 Tage hinaus,
Gaben von größeren Einzeldosen):

- a. **Tubulusinhalt:** Hypospermatogenese verstärkt,
Abschwächung der alkalischen Phosphatase.
Die SERTOLI-Zellen sind erheblich atrophisch in
denjenigen Tubuli, die durch eine Wandverdickung
gekennzeichnet sind. Histochemisch verschwinden
die hauptsächlichsten Fette und der Glycogengehalt.
Ansteigen der Ascorbinsäure.

- b. **Tubuluswand:** Verdickung der Wand.
Basalmembran läßt sich mit der McMANUS-Technik
nicht sichtbar machen. Die Tunica propria zeigt alle
Stärken der Verdickung bis zur vollständigen Hyalini-
sation. Um das hyaline Material lagern sich dünne
und kurze elastische Fasern. Zunahme der unreifen
Fibroblasten. Diese werden bei fortschreitender
Hyalinisierung in das hyaline Material eingeschlos-
sen. Mit fortschreitender Hyalinisierung nimmt die
Metachromasie ab, die Fibroblasten der Tubulus-
wände ergeben eine schwächere, histochemische
Reaktion.

- c. **Intertubuläres
Bindegewebe:** Die LEYDIG-Zellen, die Haufen gebildet haben, wer-
den immer mehr verstreut, einige atrophische
LEYDIG-Zellen sind zu beobachten. Das übliche
Netzwerk um sie herum verschwindet in zunehmendem
Maß. Immer mehr fibroblastenähnliche Zellen werden
in die Tunica propria einbezogen. Zunahme von Fibro-
blasten, Mastzellen und vereinzelt von Plasmazellen.
Fast überall Gefäßintimaverdickung. Zunahme von
kollagenen und reticulären Fasern, vor allem in Nähe
von Fibroblasten und Fibrocyten.

Die Einteilung in den Schweregrad 3 erfolgte nach der Beobachtung eines einzelnen Falles, der über 730 Tage lang täglich 50 mg Östrogen erhalten hatte.

Die Tubuli zeigen eine erhebliche Hyalinisierung, gelegentlich finden sich einige sehr wenige SERTOLI-Zellen, die meisten sind zugrunde gegangen. Große Gebiete zeigten diese Veränderungen, während in anderen noch Hypo-spermatogenese und deutliche Wandsklerose zu finden ist. Im intertubulären Zwischengewebe finden sich noch vereinzelt atrophische LEYDIG-Zellen oder fibroblastenähnliche Zellen, dagegen in Massen eine ganz neue Zellart mittlerer Größe, polygonal oder rund, mit großem Kern und dichtem Chromatin. Im Plasma mäßig allgemeine Lipide und gelegentlich Cholesterinester. Diese Zellgruppen erinnern gelegentlich an unreife LEYDIG-Zellen, die ein reichlich metachromatisches Plasma haben, einen hypertrophischen Kern und einen Nukleolus. Man findet Mastzellen verschiedenen Reifegrades und Plasmazellen, außerdem eine stärkere Sklerosierung der Gefäße.

Daß Östrogene eine schädigende Wirkung auf die Keimdrüsen von Patienten mit Prostata-Carcinom haben, steht nach der Meinung von DE LA BALZE fest. Eine der frühesten Veränderungen ist die Schädigung des germinativen Epithels. Bemerkenswert ist das Anwachsen von "Reservematerial", wie die hauptsächlichsten Lipide und Glykogen in diesem noch relativ intakten Epithel. Die alkalische Phosphatase der Kerne ist vermindert. Trotz Hypo-spermatogenese bleiben die SERTOLI-Zellen zunächst noch trophisch, behalten ihre Lipide und ihr Glykogen, werden aber ascorbinsäurereicher.

Die peritubuläre Fibrose war oft fortgeschritten, ehe es zu einem Aufhören der Spermatogenese kam. Bezüglich der Erhaltung des germinativen Epithels und der SERTOLI-Zellen erwägen DE LA BALZE, MANCINI, BUR und IRAZU die Möglichkeit, daß die Fibroblasten der Tunica propria ein Erfolgsorgan für eine bestimmte Hormonaktion ist, z. B. Gonadotropin aus der Hypophyse und Androgene, und daß sie mit der normalen oder pathologischen Fibrillogenese der Wand in Beziehung stehen.

Im Interstitium fiel das Verschwinden normaler LEYDIG-Zellen und die Häufung von fibroblastenähnlichen Zellen auf. DE LA BALZE und Mitarbeiter sind der Ansicht, daß die LEYDIG-Zellen sich in fibroblastenähnliche Zellen

umwandeln und dies ein besonderes Characteristicum der Östrogentherapie ist.

Einige Tatsachen stützen diese Theorie:

1. LEYDIG-Zellen und Fibroblasten sind beide mesenchymalen Ursprungs.
2. Das Hodenbindegewebe unterliegt wichtigen, altersmäßig bedingten und durch pathologische Einflüsse hervorgerufenen Veränderungen.
3. Im normalen erwachsenen Hoden finden sich Übergangsstufen zwischen LEYDIG-Zellen und Fibroblasten.

DE LA BALZE, MANCINI, BUR und IRAZU glauben deshalb, daß die peritubuläre und intertubuläre Fibrose als ein "aktives Phänomen" angesehen werden muß und nicht nur als ein passiver Wechsel auf Grund der Atrophie des Hodenparenchyms. In den fortgeschrittenen Stadien der Hodenschädigung nach Östrogengaben findet sich nach der Tubulusfibrose auch in einigen Gebieten eine Zunahme der Gefäßsklerose, die den Eindruck erweckt, daß zusätzlich ein Gefäßfaktor an der Schädigung beteiligt ist.

Die Anwesenheit von unreifen LEYDIG-Zellgruppen und das Auftreten einer neuen Zellart, so wie es bei dem Patienten beobachtet wurde, der 730 Tage lang täglich 50 mg erhalten hatte, verdient eine nähere Betrachtung:

Verlängerte Östrogenverabreichung bei bestimmten Mäusearten führte zu einem besonderen Typ der LEYDIG-Zellen mit Hyperplasie oder zu tumoriger Entartung. Diese Tumoren hatten Adrogenfunktionen, sie metastasierten und waren transplantabel (BURROWS und GARDNER). Diese Tumoren, wie auch diejenigen Veränderungen, die DE LA BALZE und Mitarbeiter beobachtet hatten, waren nach Östrogentherapie aufgetreten, nachdem das übrige Hodengewebe atrophiert war.

Der pathologische Mechanismus des Schweregrades 1 und 2 kann direkt oder indirekt sein. Durch veränderte Gonadotropinausschüttung der Hypophyse kann eine "indirekte Östrogenwirkung" verursacht werden. Die Applikation von großen Östrogendosen kann die Produktion von FSH und von ICSN hemmen (GREEP und JONES), sie führt zu einer Veränderung des Tubulusinhaltes, zur Fibrillogenese der Tubuluswände, einem Verschwinden der LEYDIG-Zellen und zu einer Proliferation der Fibroblasten im Zwischengewebe. Wahrscheinlich beeinflußt die FSH-Abnahme das Gleichgewicht zwischen dem germinativen Epithel und den Fibroblasten der Tubuluswand. Es kommt

zur Atrophie des Keimepithels und zu einer Hyperplasie und Fibrose der Tubuluswand. Ähnlich kann die Hemmung des ICSH auch das Verschwinden der LEYDIG-Zellen verursachen, ebenso die Fibroblastenproliferation im Zwischengewebe. DE LA BALZE, MANCINI, IRAZU und BUR weisen auf eine nicht auszuschließende Wirkung von Östrogenen auf den Hoden hin, vor allem im Hinblick auf die Kenntnis, daß Östrogene direkt auf das genitale Zwischengewebe wirken können (EMMENS und PARKES). DE LA BALZE und Mitarbeiter erwägen noch die Möglichkeit einer Einwirkung des Östrogens auf den Hoden über eine andere Drüse, z. B. die Nebenniere.

In einer Arbeit aus der Chirurgischen Universitäts-Klinik Heidelberg berichtet SCHÜTZ über "Histologische Befunde an menschlichen Hoden nach Hormonbehandlung des Prostatacarcinoms". Nach bereits mehrfachem Auftreten einer Gynäkomastie im Verlaufe der Follikelhormonbehandlung von Kranken mit Prostata-Carcinom, sind auch mehrere Fälle von Brustkrebs beim Manne im Verlauf der Hormonbehandlung mitgeteilt worden (SCHÜTZ).

Eine weitere Nebenwirkung der weiblichen Sexualhormone bei der Behandlung des Prostatacarcinoms tritt am Hoden auf, wenn die Orchidektomie nicht zusätzlich durchgeführt wird.

Während anfänglich das Prostatacarcinom allein mit Östrogenen behandelt wurde, wird seit einiger Zeit an der Chirurgischen Universitäts-Klinik Heidelberg die Orchidektomie durchgeführt.

Zur Untersuchung kamen 22 Fälle von Prostatacarcinomen, die mit Östrogenen behandelt wurden. Welches Präparat und welche Mengen gegeben wurden, ist in dem Bericht von SCHÜTZ nicht genau angegeben. In 18 Fällen wurde ohne vorherige Hormonbehandlung die Orchidektomie durchgeführt und zum Vergleich herangezogen.

Die Operationspräparate wurden in 10%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Stufenschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin, Elastica-Kernechtrot und nach VAN GIESON, einzelne Schnitte auch mit Elastica-VAN GIESON gefärbt. Weitere Gewebsscheiben wurden nach Gelatineeinbettung mit Sudan zum Fettnachweis präpariert.

SLOTOPOLSKY und SCHINZ haben 1925 zur Klassifizierung der Hodenatrophie 5 Grade angegeben:

1. Grad: es fehlen lediglich die Spermien.
2. Grad: vollständiges Fehlen von Spermien und Spermiden.
3. Grad: zusätzliche Verdickung der Tunica propria der Samenkanälchen.
4. Grad: das Samenepithel besteht lediglich aus SERTOLischen Stützzellen und Spermatogonien.
5. Grad: Verdickung und hyaline Entartung der Tunica propria, das Keimepithel ist überhaupt nicht mehr nachweisbar, die Lumina der Hodenkanälchen sind verödet und eine Fibrosis testis ist nachweisbar.

Bei allen Gewebselementen des Hodens finden sich charakteristische Veränderungen, die dem Ausmaß der Dauer der Hormonbehandlung und der Menge der zugeführten Östrogene parallel gehen.

Nach einer kurzfristigen hormonalen Vorbehandlung tritt als erste histologisch nachweisbare Folge ein Ödem des interstitiellen Bindegewebes auf. Gleichzeitig sistiert die Spermiogenese, so daß Spermien nicht mehr nachweisbar sind. Eine feintropfige Verfettung des Samengewebes und des interstitiellen Bindegewebes waren nachweisbar. Bei weiterer Hormonzufuhr werden die Kerne und das Protoplasma der Spermatocyten in das Kanälchenlumen ausgestoßen. Bei länger dauernder Östrogenzufuhr sind die Samenkanälchen lediglich von den SERTOLischen Stützzellen ausgekleidet. Gleichzeitig findet sich eine Verbreiterung der Membrana propria durch eine Vermehrung des kollagenen und elastischen Bindegewebes. Im interstitiellen Bindegewebe ist ebenfalls eine Neubildung kollagener Fasern zu beobachten. Bei langandauernder Hormonbehandlung erscheinen die LEYDIGschen Zwischenzellen im Stadium der Fibrosis testis vermindert und atrophisch. Auch die Blutgefäße des Hodens vermitteln den Eindruck einer stärker ausgeprägten Sklerose, im Vergleich zu denjenigen Orchidektomien, deren Parenchym nicht durch die Östrogenbehandlung geschädigt war.

Auffallend war nach SCHÜTZ das Auftreten von Riesenzellen beim Abstoßen von Spermatocyten in die Lumina von Hodenkanälchen bei Patienten, die mit weiblichen Sexualhormonen vorbehandelt waren. Diese Riesenzellen wurden im Vergleichspräparat nie gefunden.

Der interessanteste Befund war der Hoden eines 62jährigen Patienten. Seine Behandlung, die ambulant fortgeführt wurde, erfolgte mit Cyren-B-

forte erhalten hatte. Er entzog sich jedoch für 5 Monate der Behandlung. Erst nach Eintreten zunehmender, schlimmerer Beschwerden willigte er in die Orchidektomie ein. Die vergleichende Beobachtung mit anderen Präparaten gleicher Therapiedauer zeigte einen bemerkenswerten Befund: die erwartete Abstoßung des Samenepithels bis auf die SERTOLIschen Stützzellen blieb aus. Das Samenepithel zeigte sich in seinem histologischen Aufbau nur wenig geschädigt. Neben den Spermatocyten waren vereinzelt auch Spermatiden nachweisbar, so daß aus dem histologischen Schnitt keinesfalls die vorausgegangene Östrogenbehandlung abgelesen werden konnte.

Dieser Fall zeigt nach SCHÜTZ eindeutig und instruktiv, daß eine Regeneration des Samenepithels eintreten kann, wenn die Östrogenbehandlung zu einem Zeitpunkt unterbrochen wird, in dem Teile des Samenepithels noch nicht abgestoßen sind. Diese Regeneration wird nicht mehr möglich sein, wenn durch die Östrogenbehandlung eine Fibrosis testis erzielt wurde. Aus diesem Grunde ist die operative Kastration zusätzlich zur Östrogenbehandlung indiziert, da es bei oben beschriebener Regeneration erneut zur Bildung hormonaler Wirkstoffe kommen kann, wenn die Östrogenbehandlung zur Abstoßung des gesamten Samenepithels nicht ausreichend war (SCHÜTZ).

Der Einwand, daß die Hoden älterer Männer, die das 5. Lebensjahrzehnt überschritten haben, auch Atrophien und herdförmige Fibrosis testis zeigen, ist richtig. Doch zeigen sich hier immer noch größere Bezirke mit wohlhaltener Spermiogenese bis zum hohen Alter. In denjenigen Fällen aber, bei denen der Orchidektomie eine Behandlung mit weiblichem Sexualhormon vorausgegangen war, betreffen die degenerativen Veränderungen das gesamte Hodenparenchym und sind so ausgedehnt, daß der Untersucher ohne Kenntnis klinischer Daten, allein aus dem histologischen Bild der Hoden, die Vorbehandlung mit Östrogen ablesen kann (SCHÜTZ).

X. ALKALISCHE PHOSPHATASE.

1. Kurzer Überblick über die Entwicklung des Phosphatasenachweises.

Zu Beginn dieses Jahrhunderts entdeckten drei japanische Forscher SUZUKI, YOSHIMORA und TAKAISHI im Reis ein Ferment, das von hexaphosphorsaurem Inosit Phosphorsäure abspaltet. 1908 wurden Phosphatasen zum ersten Male im tierischen Gewebe nachgewiesen und 1912 beschrieben GROSSER und HUSLER solche Fermente im Pancreas, in den Nieren, in der Milz und im Knochen. Zehn Jahre später brachte ROBINSON das Vorhandensein der Knochenphosphatase mit dem Vorgang der Ossifikation in Beziehung.

Bis vor 18 Jahren ist das Studium dieser Fermente im Gebiet rein chemischer Bestimmungen geblieben, denn erst 1939 beschrieben GOMORI und, unabhängig von ihm, TAKAMATSU die erste histochemische Methode, die es gestattete, die Phosphatase in Schnittpräparaten mikroskopisch sichtbar zu machen. Dieses Verfahren fand weite Verbreitung, nicht zuletzt wegen der Möglichkeit zahlreicher Modifikationen.

Seit 1939 sind über die schon früher bekannten Reaktionen auf oxydierende Enzyme hinaus, zunehmend neue histochemische Fermentreaktionen entwickelt worden. NEUMANN gibt einen schematischen Überblick über die in schnellem Fluß befindliche Entwicklung:

REAKTION AUF:	VERÖFFENTLICHT:
Oxydasen	1907
Ureasen (wird angezweifelt)	1930
Phosphatasen	
alkalische Phosphatasen	1939
saure Phosphatasen	1941
Pyrophosphatase	1948
Phosphoamidase	1948
Phosphorylase	1947
Lipase	1945
Cholinesterase	1948
Azetylcholinesterase.....	1948
Zymohexase	1943
Esterase	1949
Sulfatase	
- Glucuronidase	

2. Biochemische Eigenschaften der Phosphatase.

Mit dem Ausdruck Phosphatase im weitesten Sinne bezeichnen wir jedes Ferment, das die Fähigkeit besitzt, die hydrolytische Spaltung eines Phosphorsäureesters zu katalysieren.

Im allgemeinen Gebrauch werden unter "Phosphatasen" gewöhnlich die Phosphomonoesterasen verstanden (ROCHE und THOAI). Zu diesen gehört auch die sogenannte "alkalische" Phosphatase, die sich in tierischen Geweben in außerordentlich weiter Verbreitung findet (MAYNO und ROUILLER).

Eine der charakteristischen Grundeigenschaften der Phosphatasen ist die Isodynamie: Das gleiche Substrat kann von verschiedenen Enzymvarianten gespalten werden, die sich durch das jeweils spezifische pH-Optimum und den Aktivator voneinander unterscheiden. In dieser Verschiedenheit ihres Wirkungsmilieus liegt auch der Unterschied zwischen den "sauren" und "alkalischen" Phosphatasen. Die alkalischen Phosphatasen sind in einem pH-Bereich zwischen 8,5 und 10,0 wirksam (CLOETENS) und werden unterhalb pH 5,0 inaktiv. Die saure Gruppe besitzt ihre Aktivität zwischen pH 3,0 und 6,0 und ist oberhalb pH 8,0 inaktiv. Der optimale Wirkungskreis für jede der sauren Phosphatasen ist im allgemeinen enger begrenzt als bei den im alkalischen Milieu wirksamen Fermenten.

Ohne Kenntnis des Wesens der Fermente bleiben ihre histochemischen Reaktionen und deren Bedeutung unverständlich. Deshalb in Kürze dazu folgendes (NEUMANN):

Fermente bestehen wohl allgemein aus einem Eiweißbestandteil und einer niedermolekularen prosthetischen Gruppe. Sie ermöglichen Reaktionen, die ohne sie gar nicht oder nur überaus langsam stattfinden würden. In dieser Wirkung ähneln sie chemischen Katalysatoren. Wo sich im Gewebe Fermente finden, können die von ihnen gesteuerten chemischen Reaktionen ablaufen. Wo aber solche "Biokatalysatoren" fehlen oder durch Fermentgifte inaktiviert werden (Kaliumzyanidvergiftung als Beispiel), setzen diese Reaktionen aus.

Diese Wirkung der einzelnen Fermente richtet sich jeweils auf bestimmte Verbindungen, zu welchen die Fermente passen, "wie der Schlüssel zum Schloß", und von denen sie ihre Namen haben (NEUMANN). Die Phosphatasen, auf welche sich die Ausführungen beschränken sollen, spalten und syn-

thetisieren die biologisch wichtigen Ester der Phosphorsäure. Zu diesen gehören die Phosphatide mit Lezithin, die Zucker-Phosphorsäureverbindungen des Kohlenhydratstoffwechsels und die Nucleinsäuren. Dabei spielen Phosphorylierungsprozesse bei einigen Stoffwechselvorgängen eine entscheidende Rolle, etwa bei Durchtritt von Zucker durch Grenzmembranen, dem Stoffwechsel der Nucleinsäuren oder bei der Knochenbildung.

3. Der Ablauf der Phosphatasereaktion.

Als Beispiel das Schema nach GOMORI auf "alkalische" Phosphatase (zit. n. NEUMANN):

Phosphorsäureester $\xrightarrow{\text{Phosphatase}}$ Alkohol + <u>Phosphorsäure + Ca</u> $\downarrow$ Calziumphosphat	Bebrütung
Calziumphosphat + Cobaltnitrat $\swarrow \searrow$ Cobaltphosphat + Ammoniumsulfid $\swarrow \searrow$ Cobaltsulfid	Visualisation

Histochem. Reaktion n. GOMORI auf "alkalische" Phosphatase.

Der auf bestimmte Weise vorbehandelte Gewebsschnitt wird in eine gepufferte Lösung eingestellt, die außer Calziumionen einen Phosphorsäureester enthält. Dieser diffundiert in den Gewebsschnitt und wird dort an den Stellen, wo sich aktive Phosphatase befindet, enzymatisch in seine organischen Bestandteile und in Phosphorsäure aufgespalten. Die so freiwerdende Phosphorsäure wird am Ort ihres Entstehens als unlösliches Calziumphosphat im Gewebe festgehalten. Dieses Calziumphosphat ist noch unsichtbar und muß deshalb über Cobaltphosphat zu sichtbaren, schwarzem Cobaltsulfid umgesetzt

werden. Lage und Dichte der so entstehenden schwarzen Niederschläge entsprechen bei geeigneten Bedingungen der Lokalisation und der Aktivität des Enzyms.

Der Einfluß postmortalen Veränderungen nimmt gegenüber dem lebensfrischen Material hinsichtlich der Reaktion nach zwei Stunden sowohl bei direkter Bebrütung wie auch nach Alkoholfixierung deutlich zu. Jedoch eine auffällige Änderung der Reaktionsorte konnte von EGER und GELLER bei Leberläppchen und auch in der Leberzelle selbst nicht gesehen werden. Nach vier Stunden ist die Reaktion wieder wesentlich abgeschwächt. Vor allem fehlt die Betonung einzelner Areale, im besonderen der Läppchenperipherie. Die Beobachtung von EGER und GELLER zeigten keine größere Verschiebung der Fermente durch postmortale Vorgänge, dagegen beträchtliche Veränderungen der Intensität.

4. Die Schwierigkeit histochemischer Lokalisation der alkalischen Phosphatase in den Kernen.

FEIGIN, WOLF und KABAT berichten über eine unterschiedliche Färbung von Kernen der Fibrozyten in der intestinalen Lamina propria und in der Submucosa. Hinsichtlich ihrer identischen Erscheinung und ihrer Funktion war das Ergebnis unerwartet. Sie vertreten die Ansicht, daß die unterschiedlichen Veränderungen nach dem Tode eingetreten waren und bevor das Präparat fixiert wurde. Die Größe der Granula, die eine Phosphataseaktivität anzeigen, nahm nach dem Tode sehr rapide ab, ohne jedoch einen Verlust an enzymatischer Gesamtaktivität zu zeigen. Auch wurde auf eine Diffusion alkalischer Phosphatase der Gewebsschnitte in die Inkubationslösung hingewiesen. Nach Einweichen azetonfixierter Gewebsschnitte in Wasser, ergab dieses eine Lösung mit Phosphataseaktivität.

Ein zweiter Faktor ist der Entzug des Enzyms aus dem Zytoplasma und seine offensichtliche Konzentration innerhalb des Kernes, auch wenn das Ferment im dazwischenliegenden Zytoplasma nicht wahrnehmbar wurde.

Nach FEIGIN, WOLF und KABAT wird dieser Prozeß durch Experimente angedeutet, indem Teile von Gewebsschnitten eine Zeitlang (genaue Daten sind nicht angegeben) in ein COPLIN-Gefäß mit destilliertem Wasser

gelegt wurden, bevor sie in der üblichen Art zur Färbung kamen. Die abnehmende Färbung der Orte zytoplasmatischer Aktivität ist mit der geforderten Diffusion in die Inkubationslösung vereinbar, die zunehmende Kernfärbung mit der geforderten Entfernung und Konzentration von Enzymen in die Kerne.

Wenn Objektträger in laufendem Leitungswasser geschwaschen wurden, traten diese letzteren Erscheinungen nicht auf. Gab man aber in die Inkubationsflüssigkeit Enzymlösung hinein, so war das Ergebnis eine vermehrte nucleare Färbung, was zur Annahme berechtigen kann, daß eine nucleare Konzentration möglich ist. Diese vermehrte nucleare Färbung, wie auch die enzymatische Aktivität der Lösung, kann durch Dialyse, stufenweiser Erhitzung und durch hemmende Substanzen beeinflußt werden. Diese Tatsache läßt vermuten, daß es das Enzym selbst ist, welches die vermehrte nucleare Färbung verursacht.

FEIGIN, WOLF und KABAT kamen auf Grund der oben erwähnten experimentellen Beobachtungen zu der Schlußfolgerung, daß die Beschreibung von Lokalisationen der Phosphataseaktivität in Kernen, als eine Darstellung eines physiologischen Zustandes, ungenau ist. Ebenso trügerisch können Beschreibungen sein, die sich auf Beziehungen nuclearer und zytoplasmatischer Funktion stützen.

XI. DIE VERTEILUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE IM GENITALTRAKT MÄNNLICHER SÄUGER.

KABAT und FURTH beobachteten 1941 eine geringe alkalische Phosphataseaktivität in den spermatogenetischen Zellen des erwachsenen menschlichen Hodens, im Gegensatz zur Basalmembran der Tubuli, die eine weit-
aus stärkere Reaktion für das Ferment offenbart.

Bei den Untersuchungen von BERN zeigen alle männlichen Säuger, der Hamster ausgenommen, eine alkalische Phosphataseaktivität des Zytoplasmas der sich entwickelnden Samenzellen im Hoden. Eine größere Aktivität bei der späteren Spermienentwicklung könnte beim Meerschweinchen und der Maus beobachtet werden. Diese vermehrte Reaktion ist das hauptsächlichste Erscheinungsbild in den zytoplasmatischen Rückständen in den Lumina der Tubuli. Auch die Basalmembran der Tubuli seminiferi zeigt eine starke Aktivität, mit Ausnahme bei den Kaninchen und Fledermäusen.

Die Unterschiede in der Verteilung der alkalischen Phosphatase unter den einzelnen Tieren ist in der Tabelle 1 auf Seite 39 zusammengefaßt.

Diese Untersuchungen stützen sich auf 58 geschlechtsreife männliche Säuger. Zur Untersuchung kamen 6 Mäuse, 15 Ratten, 15 holländische Kaninchen, 8 Meerschweinchen, 5 Goldhamster, 4 Fledermäuse (*Corynorhinus rafinesquii intermedius*) und 4 Opossums (*Didelphis virginiana*). Untersucht wurden der Hoden, cranialer und caudaler Nebenhoden, Vas deferens, Samenblase, einige Lappen der Prostata, die Bulbourethraldrüse, Blase, Urethra und die Praeputialdrüse.

Die einzelnen Gewebe wurden im kalten Azeton - und gelegentlich in kaltem 80% Alkohol - fixiert und nach der BARGERSchen Modifikation der GOMORI-Technik behandelt. Die Gewebe von einigen Kaninchen, Ratten und Meerschweinchen wurden drei Monate lang in Azeton aufbewahrt, ehe eine weitere Behandlung stattfand. Es zeigten sich hinsichtlich der Fermentlokalisation keinerlei auffällige Veränderungen.

Die Inkubationszeit lag, bei einem pH-Wert von 9,4 bei 37 C, zwischen 2 und 24 Stunden. Eine 18-stündige Inkubation wurde als Grundlage für vergleichende Studien gewählt.

Tab.: 1 Die Verteilung alkalischer Phosphatase im Genitalsystem
männlicher Säuger.

- | | |
|---|---|
| 1 Atrophische Tubuli | 5 Wenn anwesend |
| 2 Kein kranialer Nebenhodenabschnitt beim Meerschweinchen | 6 Aktivität auf Kapillaren begrenzt |
| 3 Einschließlich Ampulle | 7 Nur basale Schichten |
| 4 Aktivität auf Kapillaren begrenzt | 8 Stroma zwischen glatten Muskelbündeln |

Zeichenerklärung:

- | | | | |
|-----|---------------------------------|-----|---------------------------------|
| + | = starke alkäl. Phosphat. akt. | - | = keine alkäl. Phosphat. akt. |
| (+) | = schwache alkäl. Phosphat. akt | (F) | = Flecken alkäl. Phosphat. akt. |

	Ratte	Maus	Hamster	Meerschweinchen	Kaninchen	Fledermaus	Opposum
<u>HODEN</u>							
Spermat. Epithel	+	+	-	+	+	+ ¹	+
Basalmembran	+	+	+	+	(+)	-	+
Intertubul. Stroma	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
<u>CRANIALER NEBENHODEN</u>							
Epithel	+/-	+	-		+	+	-
Sperm. Sekret. -Masse	+	+	(+)		+	+	-
Subepithel. Stroma	+	+	+		+/-	+	+
<u>CAUDALER NEBENHODEN</u>							
Epithel	-	+	+	- ²	+	+	+
Sperm. Sekret. -Masse	-	+	+	+	+	+	-
Subepithel. Stroma	+	+	+	+	+	+	+
<u>VAS DEFERENS</u>							
Epithel	-	-	+	-	+ ³	- ³	-
Subepithel. Stroma	+	+	+(F)	(+)(F)	+	+	+(+)(F)
Fibromuskul. Wand	+	+	-	(+)(F)	-	-	+ ⁴
<u>SAMENBLASE</u>							
Epithel	-	-	-	+	+/+(+)(F)		
Sekretionsmasse	-	-	-	+(F)	+ ⁵		
Subepithel. Stroma	+	+	+(+)(F)	-	-		
Fibromuskul. Wand	+	+	-	(+)(F)	-		
<u>BULBOURETHRALDRÜSE</u>							
Acinöses Epithel	+	+	-	(+)(F)	+(F)		
Interacinöses Stroma	+	+	+(F)	-	+		-
<u>PRAEPUTIALDRÜSE</u>							
Acinöses Epithel	+	+(F)					
Gangepithel	-	(+)(F)					
Stroma	-	-					
<u>BLASE</u>							
Epithel	+	+	(+) ⁷	+ ⁷	+ ⁷	-	-
Subepithel. Stroma	-	+	-	+	+	-	+(F) ⁶
Fibromuskul. Wand	-	+(F) ⁸	-	-	-	-	-
<u>URETHRA</u>							
Epithel	-	-	+(F)	-	-		
Subepithel. Stroma	+	+	+	+(F)	+(F)		

Ebenfalls beobachtete BOURNE (1943) alkalische Phosphataseaktivität im Meerschweinchenhoden.

Im Gegensatz dazu stehen die Berichte von SOULAIRAC und THIBAUT. Nach ihren Beobachtungen soll der Hoden als negativ für alkalische Phosphatase angesehen werden. Leider fehlt es bei diesen Autoren an Angaben über die Dauer der Inkubation und an technischen Einzelheiten, so daß es unmöglich ist, Differenzen zu klären (BERN). Auf der anderen Seite stimmen die tierexperimentellen Beobachtungen BERNs mit denen von GOMORI überein, die sich auf eine 1 1/2 stündige Inkubation gründen.

GOMORI berichtet 1941 in seiner Arbeit über "die Verteilung von Phosphatase in normalen Organen und Geweben" von einem negativen Bild der Hoden von Mensch und Hund.

Diese histochemische Studie GOMORIs steht im Gegensatz zu der von MANCINI, NOLAZCO und DE LA BALZE. Ihre Arbeit gründet sich auf Untersuchungen an 16 gesunden Männern im Alter zwischen 26 und 70 Jahren. Hoden, Hormonausscheidung im Urin und Spermatogramm waren normal. Das biotisch gewonnene Material wurde jeweils in vier gleiche Teile zerlegt, in vier verschiedene Fixierlösungen gebracht, wovon die Lösung 80 % Alkohols das Reagens für alkalische Phosphatase war. Am reichlichsten beherbergten dieses Ferment die Samenepithelien, die Fibroblasten und Fibrozyten der Tubuluswandungen und des interstitiellen Gewebes, während nur die endgültig ausgereiften LEYDIG-Zellen ganz davon frei waren.

MANCINI und Mitarbeiter unterscheiden zwei Arten von LEYDIG-Zellen: die reife und die unreife Form. In der unreifen Gruppe mit basophilem Protoplasma, im Gegensatz zum acidophilen der reifen Art, bemerkten sie ein leichtes Auftreten von alkalischer Phosphatase.

Das folgende Schema soll eine kurze Übersicht liefern. Es ist aus der Tabelle von MANCINI, NOLAZCO und DE LA BALZE: "Histochemical study on normal adult human testes" entnommen.

Tab. 2:

Histochemische Technik	Keimepithel			SERTOLI-Zellen	Tubuluswandung						Intertubuläres Bindegewebe				
	Spermatogonien	Spermatocyten	Spermatiden		Basalmembran			Tunica propria			Unreife LEYDIG-Zellen	Reife LEYDIG-Zellen	Fibroblasten	Fibrillen	Interzelluläre amorphe Substanz
					Amorphe Substanz	Fibrillen	Fibrozyten	Amorphe Substanz	Fibrillen	Fibroblasten					
Alkalische Phosphatase	+++	+++	+	(+)	+						(+)	(+)		(+)	

Zeichenerklärung:

Die Abwesenheit eines Zeichens bedeutet eine negative, (+) eine leichte, + eine mittelstarke, ++ eine starke, und +++ eine sehr starke Reaktion.

Die Gegenwart intensiver alkalischer Phosphataseaktivität in den Kernen des Keimepithels kann mit dem Wachstum und mit der Ausbildung von Nucleoproteinen dieser Zellelemente in Zusammenhang gebracht werden. Die SERTOLI-Zellen, im allgemeinen positiv für Glycogen und Lipoid, zeigen einen negativen Befund für freies Cholesterin und Cholesterinester, sind aber in ihrem Zellkern für die alkalische Phosphatase mäßig positiv. In der Tubuluswandung zeigt die Basalmembran ebenfalls alkalische Phosphatase. Auch die Zellkerne der Fibroblasten der Tunica propria zeigen eine positive Reaktion. Ihr histochemisches Charakteristikum kann mit anderen aktiv tätigen Fibroblasten verglichen werden, wie DANIELLI, FELL und KODOCEK als Beispiel das Granulationsgewebe von Wunden angeben, das die gleiche enzymatische Tätigkeit zeigt. Aber auch die freien Fibroblasten des intertubulären Bindegewebes zeigten die gleiche Reaktion.

Die Untersuchungen MONTAGNAs stimmen mit den obigen Ausführungen im Prinzip überein. Als abweichendes Ergebnis seien hier die Fibroblasten erwähnt, deren Phosphataseaktivität von MONTAGNA (1952 b) im Gegensatz zu MANCINI als reichlich bezeichnet wird.

XII. VERÄNDERUNGEN IN DER VERTEILUNG UND KONZENTRATION DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE IM GEWEBE VON RATTEN NACH HYPOPHYSEKТОMIE ODER GONADEKTOMIE UND NACH SUBSTITUTIONSTHERAPIE.

1946 zeigten BIDDULPH, MEYER und McSHAN Konzentrationsveränderungen der Succinodehydrogenase und anderer Enzyme während verschiedener Stadien des Fortpflanzungszyklus von Ratten im Ovar. Im gleichen Jahr untersuchten HUGGINS und RUSSEL die Auswirkung verschiedener hormoneller Bedingungen auf die Ansammlung von Phosphatase in der Prostata. 1947 wurden von ATKINSON und ENGLE, sowie von ATKINSON und ELFTMAN Verschiebungen in der alkalischen Phosphataseaktivität im Uterus mit dem Fortpflanzungszyklus bei der Maus und den Affen in Zusammenhang gebracht.

Histochemische Studien auf diesem Untersuchungsgebiet haben eine unterschiedlich wechselnde Phosphataseaktivität bei verschiedenen physiologischen Stadien ergeben. 1945 wurden von WISLOCKI und DEMPSEY der Uterus untersucht, die Thyreoidea 1946 von DEMPSEY und SINGER, 1947 die Brustdrüse von DEMPSEY, BUNTING und WISLOCKI und ebenfalls im Jahre 1947 von DEMPSEY und WISLOCKI die Placenta.

Da die Funktion all dieser Organe hormonell überwacht wird, ist es wichtig, die Auswirkung endokriner Stimulation auf die Phosphataseaktivität an einer Reihe von Erfolgsorganen direkt zu studieren. So untersuchten DEMPSEY, GREEP und DEANE die zytochemische Verteilung alkalischer Phosphatase an bestimmten Organen und Geweben von Ratten nach Hypophysektomie, Gonadektomie und nach Substitutionstherapie.

Zehn Tiere wurden hypophysektomiert, vier wurden gonadektomiert. Je eines von beiden Geschlechtern wurde nach einem Monat ohne jegliche Behandlung getötet. Bei den kastrierten Tieren wurden ebenfalls als Kontrolle je ein männliches und ein weibliches unbehandelt getötet.

Als Substitutionshormone kamen zur Anwendung:

1. Azeton-Trockenpulver von Rattenhypophysen
(in Salzlösung)
2. Progynon B, SCHERING (ölig)
3. Testosteron propionat, SCHERING (ölig)

Die Organe wurden im kalten 80% Alkohol fixiert. Die Paraffinschnitte wurden auf alkalische Phosphatase nach der GOMORIschen Methode in einer Modifikation nach DEMPSEY und DEANE (1946) präpariert und gefärbt. Die Pufferlösung hatte den pH-Wert von 9,5. Die Inkubationszeit lag jeweils zwischen 3,6 und 24 Stunden bei 37°C.

Die nachfolgende Tabelle bringt eine übersichtliche Zusammenstellung von DEMPSEY und DEANE über die experimentelle Behandlungsart bei den einzelnen Ratten:

Tab.: 3 Behandlungsart der einzelnen Ratten zum Studium der alkalischen Phosphatase.

Operation	Hormonbehandlung (Tage nach der Operation)	Zeitpunkt der Autopsie nach der Operation
Männlich		
--	--	--
Hypophysektomie	--	26
Hypophysektomie	--	34
Hypophysektomie	--	120
Hypophysektomie	--	120
Hypophysektomie	(1) Hypophysenpulver (26-33)	34
Hypophysektomie	(2) Östrogen (26-33)	34
Ovarektomie	--	26
Ovarektomie	Östrogen (26-33)	34
Weiblich		
--	--	--
Hypophysektomie	--	26
Hypophysektomie	--	34
Hypophysektomie	Hypophysenpulver (26-33)	34
Hypophysektomie	(3) Androgen (26-33)	34
Kastration	--	26
Kastration	Androgen (26-33)	34
(1) = 2,5 Rattenhypophysen täglich (Aceton-Trockenpulver in Salzlösung)		
(2) = 10 Ratteneinheiten täglich (Progynon B, SCHERING, ölig)		
(3) = 2,5 mg täglich (Testosteronpropionat, SCHERING, ölig)		

Nach DEMPSEY und Mitarbeitern kommt die alkalische Phosphatase sowohl in den Tubuli als auch im intertubulären Gewebe des normalen Rattenhodens vor. In den Tubuli lag die hervorstechendste Reaktion bei den Spermatiden und in einer haarscharf abgegrenzten Zone der Basalmembran, die die Tubuli umgibt. In dieser Membran erschienen hauptsächlich flache Zellen, deren langgezogener Kern dunkler als das Zytoplasma war. In manchen Abschnitten ist diese Basalmembran durch einen klaren Zwischenraum in zwei Lamellen gespalten. Unter den tubulären Elementen geben die Kerne der Spermatogonien und die Chromosomen der Spermatozyten eine mäßige Reaktion. Dieses Bild stimmt im allgemeinen mit den Beobachtungen BERNs überein.

Das intertubuläre Bindegewebe zeigt einen mengenmäßigen Unterschied an alkalischer Phosphatase. Am auffallendsten sind die Endothelien entlang den Blutgefäßen. Das Endothel der Arterien, Venen und der kleineren Arteriolen, Venen und Kapillaren war immer von gleich starker Reaktion. Die interstitiellen Zellen waren diffus matt gefärbt. Eine Unterscheidung zwischen intertubulären Zellen, die eine Mischung von LEYDIG-Zellen und bindegewebigen Elementen darstellen, war nicht möglich, weil die Phosphatasereaktion bei allen in der gleichen matten Form ausfiel. Auch hier ergibt sich eine Übereinstimmung mit MONTAGNA sowie MANCINI, NOLAZCO und DE LA BALZE.

Nach Hypophysektomie wird der Rattenhoden für alkalische Phosphatase völlig negativ. Wird durch Hypophysengaben das Enzym ersetzt, kehrt das Ferment zu seiner ursprünglichen Verteilung und Intensität zurück (DEMPSEY, GREEP und DEANE).

1949 berichtete WISLOCKI über die Anwesenheit alkalischer Phosphatase im Hoden von vier Virginiahirschen und zwei Japanhirschen, die jeweils im Herbst zur Brunftzeit und im Juni, dem Zeitpunkt der sexuell inaktiven Phase, untersucht worden waren. Die chemische Darstellung erfolgte nach GOMORI (1941) (s. auch Seite 6).

Die interstitiellen Zellen enthalten im Herbst Züge alkalischer Phosphatase. Die Arteriolenwandungen und die Basalmembranen zeigen reichlich Aktivität, die allerdings in der inaktiven Phase verschwindet. Die Zellen der Samenkanälchen enthalten zur Herbstzeit große Mengen dieses Ferments,

dessen Lokalisation im Plasma der Keimzellen ist und ganz besonders stark in den Spermatiden vorkommt. Die Kerne sind weniger tief gefärbt. Ebenfalls findet sie sich in den SERTOLI-Zellen sowie im Restplasma der Spermatiden in den Kanälchenlichtungen. Im Juni nimmt diese Verteilung stark ab.

Eine weitere Arbeit zur Frage einer veränderten Verteilung der alkalischen Phosphatase im Hoden und dessen Anhangsgebilden ist 1951 von KAR und GHOSH veröffentlicht worden.

28 Meerschweinchen standen als Versuchstiere zur Verfügung. Vier davon blieben unbehandelt als Kontrollen. Die restlichen 24 wurden in sechs Einzelgruppen aufgeteilt. Die Tiere bekamen jeweils drei Injektionen pro Tag. Folgende Präparate kamen zur Anwendung:

- | | | |
|----|--|-------------------------|
| 1) | Testosteronpropionat | 12,5 mg pro Behandlung |
| 2) | Desoxycorticosteronacetat (DCA) | |
| 3) | Progesteron | |
| 4) | Oestradioldipropionat | JEWELLS 5 mg pro Injekt |
| 5) | Diäthylstilboestrol | |
| 6) | Gonadotropes Hormon - Serumgonadotropin in destilliertem Wasser aufgelöst, in einer Dosierung von 400 I. E. pro Injektion angewandt. | |

Die Autopsie erfolgte 24 Stunden nach der letzten Injektion. Die Gewebstücke wurden in vergälltem 80% Alkohol oder 10% Formaldehyd fixiert. Für die Paraffinschnitte kam der GOMORIsche Phosphatasenachweis zur Anwendung. Die Inkubationszeit betrug drei Stunden; keine Gegenfärbung.

Die Vergleichspräparate unbehandelter Versuchstiere ergeben nach KAR und GHOSH folgenden Befund für die alkalische Phosphatase:

Die Basalmembran der Tubuli färbt sich positiv. Die enzymatische Aktivität ist in allen tubulären Elementen nachzuweisen. Die Kerne der Spermatogonien und Spermatozyten zeigen eine intensivere Aktivität als ihr Zytoplasma. Nur die SERTOLI-Zellen zeigen sowohl im Kern als auch im Zytoplasma eine gleichmäßig starke fermentative Aktivität. Unter den intertubulären Elementen zeigen die Endothelien der Blutgefäße und die Kerne der LEYDIG-Zellen eine starke Phosphatasereaktion, das Zytoplasma von letzteren ist nur mäßig angefärbt.

Dieser Befund steht im Gegensatz zu dem von BERN (1949) und GOMORI (1941), die einen negativen Befund für das interstitielle Stroma erhoben haben. Zum gleichen positiven Ergebnis wie KAR und GHOSH kommen DEMPSEY, GREEP und DEANE sowie MONTAGNA. WISLOCKI weist auf eine Reaktion des Basalabschnittes der Spermatozoenköpfe hin, die nur in diesem Abschnitt eine Phosphatasereaktion geben.

Die Ergebnisse in der Verteilung von alkalischer Phosphatase im Meerschweinchenhoden bei verschiedenartigen Hormonpräparaten:

- 1) TESTOSTERONPROPIONAT: Es kommt zum völligen Verschwinden der Phosphataseaktivität in praktisch allen Abschnitten des Hodens.
- 2) DESOXYCORTICOSTERONACETAT: Es erfolgt eine weitgehende Abnahme der Phosphataseaktivität im Hoden. Geringe Ansammlungen können noch in den Spermatogonien, Spermatozyten und im Endothel der Blutgefäße beobachtet werden.
(DCA)
- 3) PROGESTERON: Eine allgemeine Einschränkung der Phosphatase ist im ganzen Organ zu beobachten. Die Basalmembran der Tubuli färbt sich matt, die zelligen Elemente zeigen eine positive Reaktion. Allerdings ist die Intensität, an den Kontrollpräparaten gemessen, wesentlich geringer. Im Interstitium ist das Enzym noch gut in den Endothelien der Blutgefäße zu finden, aber völlig in den LEYDIG-Zellen verschwunden.
- 4) OESTRADIOLDIPROPIONAT: Ein typischer Kastrationseffekt ist in den Hoden der behandelten Tiere zu sehen. Völliger Verlust der Phosphataseaktivität in allen Hodenabschnitten.
- 5) DIÄTHYLSTILBÖSTROL: Die Basalmembran gibt eine matte Reaktion, nur mäßige Kernphosphatase in den tubulären Elementen. Eine ähnliche Reaktion ist in den LEYDIG-Zellen zu beobachten, das Endothel der Interstitiellen Blutkapillaren zeigt dagegen eine hervorste-
chendere alkalische Phosphataseaktivität.

- 6) GONADOTROPES HORMON: Histologisch ist eine Stimulation in einigen Hodenabschnitten zu beobachten. Aber auch hier ist eine deutliche Verminderung enzymatischer Gesamtaktivität zu bemerken.

Das nachfolgende Schema von KAR und GHOSH zeigt die Verteilung der alkalischen Phosphatase der einzelnen Genitalabschnitte in einer zusammenfassenden Übersicht:

Tab. 4: Verteilung der alkalischen Phosphatase im Genitaltrakt von normalen und hormonal behandelten männlichen Meerschweinchen.

	Kontrollen	Androgen	DCA	Progesteron	Oestradiol	Stilboestrol	Gonadotropes Hormon
HODEN							
Basalmembran	++	-	-	+(F)	-	+(F)	+(F)
Samenepithel	++	-	+(F)	+	-	+	+(F)
Interstitium	++	-	+(F)	+	-	+	+(F)
SAMENBLASE							
Epithel	++	+	+	+	+	+(F)	++
Fibromuskuläres Stroma	-	-	-	-	-	+(F)	-
PROSTATA							
Epithel	+(F)	-	-	-	++	+	+(F)
Basalmembran	-	-	-	-	-	-	-
NEBENHODEN							
Epithel	++ ⁿ	++ ⁿ	++ ⁿ	++ ⁿ	++ ⁿ	++ ⁿ	++ ⁿ
Basalmembran	++	+	++	++	++	+	++
VAS DEFERENS							
Epithel	+(F)	-	+(F)	+(F)	+ ⁿ (F)	++ ⁿ	+ ⁿ (F)
Fibromuskuläres Stroma	-	-	-	-	++	++	-

Zeichenerklärung:

- + = Positive Reaktion +(F) = Geringe Reaktion
 ++ = Sehr starke Reaktion n = Nur Kern-Phosphatase-aktivität
 - = Negative Reaktion

XIII. EIGENE UNTERSUCHUNGEN ÜBER ALKALISCHE PHOSPHATASE AN MENSCHLICHEM BIOPSIEMATERIAL.

Seit etwa zwei Jahren werden an der Universitäts-Hautklinik Würzburg histochemische Untersuchungen u. a. auf alkalische Phosphatase durchgeführt (Dr. HORNSTEIN). Eine Auswahl des einschlägigen Biopsiematerials soll in folgendem hinsichtlich der Verteilung der alkalischen Phosphatase untersucht werden. Die Ausführung erfolgte unter der Anleitung und Überprüfung durch Herrn Dr. HORNSTEIN.

Der Beurteilung der alkalischen Phosphatasereaktion wird der jeweilige histologische Biopsiefund (Dr. HORNSTEIN) vorangestellt.

Zeichenerläuterung:

- = ganz schwach positiv
- = schwach bis mäßig positiv (Zellkerne gut abgrenzbar)
- = stark positiv (Zellkerne noch erkennbar)
- = stark positiv (diffuse Schwärzung der ganzen Zelle)

Fall 1	:	B., Leo, Schreiner, 40 Jahre (Histol. Nr. 528/57)
Klin. Diagnose	:	Azoospermie oder Aplasie
Histolog. Befund	:	Relative Verbreiterung der Tunica albuginea. Darunter einige geschlängelte (venöse?) Gefäße mit Intimahyalinisierung und -verbreiterung. Enorme Leydigzellhyperplasie aus uneinheitlichen Zellen, nesterförmig aufgehellt, mehr diffus pigmentiert. Dazwischen einige Tubuli, teils noch fast normal weit, überwiegend aber eng oder vollständig obliteriert. Als Inhalt nur Sertolizellen, von ganz vereinzelt, fibrozytenartig der Tubuluswand aufliegenden Zellelementen abgesehen. Hyalinisierung der Tunica propria, keine auffällige Verbreiterung der Basalmembran. Lipoid der Leydigzellen fast gleich null, der Sertolizellen, altersentsprechend jedenfalls verringert.
Beurteilung	:	Wahrscheinlich Endzustand eines primären Tubulusschadens (Stad. IV). Germinale Aplasie unwahrscheinlich. Allerdings könnte es sich um eine erworbene germinale Aplasie handeln (für eine gewisse Entfaltung spricht die unterschiedliche Weite der Tubuli). Die Leydigzellhyperplasie erscheint funktionell unterwertig (fast lipoidfrei!).
Histochemischer Befund	:	Tubuli negativ, Tubuluswandungen meist negativ, außer dort, wo sie an fleckförmige, deutlich positive Leydigzellnester angrenzen. Die Mehrzahl

der Leydigzellen negativ, fleckförmig, wie bereits erwähnt, deutlich positiv . Kapillaren Kontrolluntersuchung negativ.

- Fall 2 : K., Bruno, Schreiner, 36 Jahre (Histol.Nr.499/56)
- Klin. Diagnose : Azoospermie
- Histolog. Befund : Unter Berücksichtigung des Alters des Patienten fast normales Tubulusbild, jedenfalls ohne schwere tubuläre Schädigung. Auffällig ist dagegen eine Wandquellung der kleinen Gefäße mit geringer Metachromasie, die teilweise durch Insudation bedingt sein dürfte. Ungewöhnlich ist auch die vorzeitige Leydigzellpigmentvermehrung.
- Histochemischer Befund : Tubuli mit Bevorzugung der basalen Zellelemente (Zytoplasma stärker als Kern). Auch im Lumen positive Elemente abgeschilfert. - Basalmembran fleckförmig positiv, Tunica propria negativ, Kapillaren im ganzen schwächer als Tubuli. Keine Kontrolluntersuchung.
- Fall 3 : L., Erich, Maurer, 31 Jahre (Histol.Nr. 423/56)
- Klin. Diagnose : Hochgradige Azoospermie
- Histolog. Befund : Im rechten Hoden normale Tubuluskaliber bei vermehrter zentraler Desquamation und Zusammensinterung unterschiedlich ausgereifter germinaler Zellelemente, während die Tubulusperipherie relativ zellarm und netzig aufgelockert erscheint. In allen Tubuli Spermatozoen nachweisbar, vielleicht quantitativ etwas verringert; auf vielen noch sog. Akroblast nachweisbar. Manche Spermatozyten I. Ordnung mit verdichteten Kernen, sonst keine wesentlichen Atypien nachweisbar. - Interstitium ödematös mit spärlichen Leydigzellhäufchen, die vielfach Pigment enthalten. Im linken Hoden deutliche, aber ganz unterschiedlich fortgeschrittene Degenerationszeichen aller Tubuli, von allgemeiner Zellverminderung und zentraler Desquamation bis zu hochgradiger Tubulusschrumpfung mit gerunzelter, verdickter Basalmembran und wenigen undifferenzierten Zellen. Tubuluswände durch Apoptose von Fibroblasten und kollagenen (weniger elastischen) Fasern deutlich verdickt. Im Interstitium Mastzellen etwas vermehrt, Leydigzellen lipoidarm, quantitativ wohl im Bereich der Norm; manche Arteriole zeigen Wandverdickung im Sinne einer mäßigen Arteriosklerose; in einer kleinen Arterie finden sich die Zeichen eines organisierten Thrombus mit teilweiser Rekanalisation.

- Beurteilung : Rechter Hoden infolge Ödem im Interstitium (sowie an der Tubulusperipherie), allgemeiner Desquamation germinaler Zellelemente und leichter Atypien im Sinne eines Tubulusschadens I/II alteriert. Linker Hoden in weit fortgeschrittener Degeneration und Atrophie des Tubulusapparates begriffen, je nach den einzelnen Tubuli zwischen Stadium II und IV stehend. Eine mäßige Arteriosklerose, die aber auf der Gegenseite in dieser Ausprägung fehlt und somit auf einen möglichen lokalen Faktor hinweist, dürfte von Mitbedeutung sein.
- Histochemischer Befund : Linker Hoden: Auffälligerweise besteht nur im Zentrum des Exzisats positive Reaktion, die wahrscheinlich fixierungsbedingt ist. Auch diese Reaktion ist nur mit Vorbehalt zu beurteilen, da auch in den einzelnen Tubuli variable Reaktion. Peripher , außer Sertolizellen, zentral negativ oder . Leydigzellen überall negativ. Kapillaren , teilweise auch in den sonst phosphatasefreien Randabschnitten. Rechter Hoden: Lediglich schwache Kernreaktion, wahrscheinlich diffusionsbedingt. Sonst alles, inklusiv Kapillaren, negativ. Ein Zusammenhang mit der linksseitigen stärkeren Arteriosklerose ist nicht sicher annehmbar.
Keine Kontrolluntersuchung.
- Fall 4 : L., Franz, Arbeiter, 46 Jahre (Histol.Nr. 533/56)
- Klin. Diagnose : Impotentia coeundi.
- Histolog. Befund : Im rechten Hoden unregelmäßig verstreute Tubulus-schrumpfung mit hyaliner tubulärer Fibrosierung und peritubulärer Elastose. Intratubulär lassen sich - allerdings desorganisiert und ohne nachweisbare Zellteilungstätigkeit - vielfach noch Spermien und germinale Vorstufen nachweisen; andere Tubuli weisen komplette, hyaline Verödung auf. Ursprüngliche Basalmembranen nicht erkennbar. Im Interstitium leichte Leydigzellvermehrung mit Pigmentierung und Kristalloiden. Arteriolen und Venolen leicht wandverbreitert, kleine Aterien intramural verdickt. Im linken Hoden im Hinblick auf das Alter des Probanden nur Tubulusschädigung I. Grades erkennbar. Interstitium etwa hinsichtlich Leydigzellen gleich dem rechten Hoden.
- Beurteilung : Schwerer rechtsseitiger Hodenparenchymschaden mit eigenartiger peritubulärer Fibrosierung; nur geringfügiger linksseitiger Hodenparenchymschaden.
- Histochemischer Befund : Rechter Hoden: Tubuli überwiegend , teilweise auch aktiv, Kerne dabei leicht betont. Breite, stark positive Basalmembran. Breite, schwach positive, vereinzelt kernpositive Tunica propria. Leydigzellen meist nega-

tiv, einzelne Nester schwach positiv (Artefakt?).
Linker Hoden: Tubuli , Basalmembran
 teilweise positiv und schwächer, Tunica propria
 schwach kernpositiv oder -negativ. - Leydigzellen
 schwach positiv, etwa , überwiegend aber ne-
 gativ. Kapillaren positiv.
 Keine Kontrolluntersuchung.

Fall 5 : L., Helmut, Angestellter, 19 Jahre (Histol. Nr. 519/57)
 Klin. Diagnose : Fertiler Eunuche. (Disproport. Hochwuchs, kein
 Bartwuchs, angedeutete fem. Schambehaarung, schwe-
 re Gynaekomastie mit Striae distensae an den Brüsten
 und am Bauch. Im Spermatogramm 91 Mill/ccm).
 Histolog. Befund : Regulär weite Tubuli mit aufgelockerter, mehrschich-
 tiger Zellauskleidung. Auffällig wenig Mitosen ange-
 sichts der reichlichen Spermien und Praespermien.
 Tubuluswandung durchwegs zart. Interstitium ödema-
 tös, mit sehr kleinen Häufchen von Leydigzellen, die
 lipoidvermindert und kleinkernig sind.
 Beurteilung : Mit der klinischen Diagnose "Fertiler Eunuchoidismus"
 wohl vereinbar.
 Histochemischer Befund : Deutliche, allerdings kernbetonte Aktivität in den Tubu-
 li, unter Bevorzugung der basalen Zellformen - Sper-
 matogonien und Spermatozyten. Sertolizellen praktisch
 negativ. Spermien , wahrscheinlich Absorptions-
 effekt. Basalmembran negativ, ebenso Tubuluswan-
 dung, Kapillaren , Interstitium negativ.
 Kontrolluntersuchung negativ.

Fall 6 : M., Oskar, Bauarbeiter, 34 Jahre (Histol. Nr. 713/56)
 Klin. Diagnose : Beidseitige Hodenatrophie (rechts eichelgroß, links
 überhaupt nicht auffindbar; femininer Habitus, hohe
 Stimme).
 Histolog. Befund : Enorme Leydigzellhyperplasie mit nur ganz verein-
 zelten total fibrösen oder noch Sertolizellen enthal-
 tenden Tubuli (rechter Hoden).
 Bei der linksseitig durchgeführten Probeexzision
 wurde Ductus deferens exzidiert.
 Histochemischer Befund : Innerhalb der massiven Leydigzellwucherung sind
 kleine und großflächige Bezirke in ganz unregelmä-
 ßiger Verteilung , dazwischen negativ. Zytoplasma
 stärker als Kerne reagierend. Tunica albuginea, bis
 auf Fibrozytenkerne und einzelne Kapillaren, negativ.
 Linksseitig kommt Nebenhodengewebe zur Darstellung,
 das mit Ausnahme der Kapillaren, sowie der einzel-
 nen verstreuten Mastzellen, deren Körnchen stark
 positiv sind, negativ reagiert.
 Keine Kontrolluntersuchung.

- Fall 7 : M., Oswald, Landwirt, 34 Jahre (Histol. Nr. 820/56)
- Klin. Diagnose : Azoospermie.
- Histol. Befund : Im Exzisionsmaterial nur - ziemlich breite - Tunica albuginea und adenomartig gewucherte Leydigzellen getroffen. Dazwischen mehrere, vorwiegend größere arterielle Gefäße mit leichter Intimafibrose. Lebhaftes Pigmentierung, wechselnd große Zellkerne, deutliche Lipoidvakuolen in den dicht gelagerten Zellen vorhanden, ein Teil scheint aber nur mäßig entfaltet. Hodenkanälchen sind auf sämtlichen Schnitten nicht nachweisbar. Keine Succinodehydrase-Aktivität, was im Verein mit anderen Kriterien für funktionelle Unterwertigkeit der Leydigzellen spricht.
- Beurteilung : Adenomartige Leydigzellhyperplasie ohne nachweisbaren Tubulusapparat. Keine germinale Aplasie. Nach dem histologischen Bild waren klinisch eunuchoiden Züge zu erwarten, im übrigen eine maximale FSH-Ausschüttung. Es kann sich um den Endzustand eines Klinefelter-Syndroms oder eines degenerativ-atrophischen Tubulusschadens handeln.
- Histochemischer Befund : Kapillaren inmitten einer im wesentlichen negativen Leydigzellhyperplasie. Stark positive Randabschnitte, wohl artefiziell bedingt. Keine Kontrolluntersuchung.
- Fall 8 : M., Paul, Kaufmann, 30 Jahre (Histol. Nr. 55/57)
- Klin. Diagnose : Hochgradige Oligaspermie (3-5 Mill.), hochgradige Hydrocele.
- Histol. Befund : Beiderseits praktisch reguläres Hodenparenchym. Interstitien ödematös (artefiziell?) gelockert, Leydigzellnester klein, mit etwas Pigment, anscheinend wenig lipoidhaltig.
- Beurteilung : Kein Anhalt für intratestale Störung. Schädigung der ableitenden Samenwege ursächlich anzunehmen (funktionell?).
- Histochemischer Befund : Rechter Hoden: Einheitlich starke positive Reaktion der Tubuli, bzw. des Samenepithels. Wo Sertolizellen den Kanalsaum bilden und zentrale Zellabschilferung besteht, sind die Sertolizellen höchstens Spermatogonien stark positiv, oft unter Aussparung des Kernes, oft auch bandförmig. Basalmembran vielfach positiv, Tunica propria teils negativ, teils positiv (Diffusion). Hie und da Kerne und Umgebung positiv. Interstitium wie üblich.
Linker Hoden: Ähnliches Bild wie rechts. Wieder deutlicher Unterschied zwischen schwach positiver Sertolizellen und Samenreifungszellen. Tubuluswand, außer Basalmembran, überwiegend negativ. Interstitium wie üblich. Keine Kontrolluntersuchung.

- Fall 9 : N., Johann, Arbeiter, 26 Jahre (Histol. Nr. 726/56)
- Klin. Diagnose : Hochgradige Oligospermie.
- Histol. Befund : Links hochgradig atrophisches Hodenkanälchenparenchym mit interstitieller Fibrose, rechts leichtere Schädigung (Stadium I/II). Erhöhung von FSH nach dem histologischen Bild zu erwarten.
- Histochemischer Befund : Rechter Hoden: Tubuli überwiegend , Kerne dabei stärker als Zytoplasma reagierend (Artefakte?). Basalmembran unregelmäßig positiv, Tunica propria meist negativ, hie und da positiv in der Umgebung länglicher Kerne. Interstitium außer Kapillaren negativ.
Linker Hoden: Umkehr der normalen Phosphataseverteilung, indem die Tubuli, mit Ausnahme schwach anfärbarer Zellkerne der Sertolizellen, negativ sind, während das Interstitium ist. Dabei treten spin-delige Kerne im Interstitium deutlich hervor. Kapillaren
 Keine Kontrolluntersuchung.
- Fall 10 : P., Emil, Landwirt, 32 Jahre (Histol. Nr. 75/56)
- Klin. Diagnose : Verdacht auf Spermatogenesestop.
- Histol. Befund : Unterschiedlich kalibrierte Hodenkanälchen, teilweise mit zarter kollagenfaseriger peritubulärer Sklerose, aber mit meist gut nachweisbaren Stufen der spermatogenetischen Reihe bis zu Spermien, letztere quantitativ etwas vermindert.
Im linken Hoden fleckförmige Hyalinisierung und Verdünnung von Tubuli, sowie streifige Fibrosierung. Das Zellbild des rechten Hodens infolge anderartiger Fixierung nicht gleichaussehend wie links, im wesentlichen aber gleichfalls gut nachweisbaren Spermatogenese.
Im rechten Hoden keine verödeten Hodenkanälchen nachweisbar. Leydigzellen mäßig Lipoidgespeichert, unauffällig.
- Beurteilung : Kein Anhalt für Spermatogenese-Stop. Die fleckförmig eingestreuten regressiven Kanälchenveränderungen lassen an einen posttraumatischen oder eher postinfektiösen Zustand denken.
- Diagnose : Unregelmäßig disseminierte Tubulusfibrose (postinfektiös?).
- Histochemischer Befund : In den Tubuli sind die Zellen der Samenreifungsreife - am stärksten Spermatogonien und Spermatozyten I. Ordnung, gering, soweit vorhanden, Spermatozyten II. Ordnung - . Die Sertolizellen sind praktisch negativ. Basalmembran fleckig positiv, Tunica propria negativ, Leydigzellen meist negativ. Kapillaren
 Keine Kontrolluntersuchung.

- Fall 11 : Sch., Isidor, Mechaniker, 37 Jahre (Histol.Nr.725/56)
- Klin. Diagnose : Azoospermie, Pendelhoden.
- Histol. Beurteilung : Anscheinend primäre Hodenschädigung mit etwas ungewohntem Bild. Degenerative Tubulusveränderungen ähnlich (aber wohl nicht identisch) dem sog. spermatogenetischen Stillstand. Keine interstitiellen Gefäßveränderungen nachweisbar. Leydigzellen spärlich, im einzelnen aber anscheinend normal entfaltet.
- Histochemischer Befund : In den Tubuli deutliche Randaktivität mit Aussparung der Kerne, verschiedentlich auch zentral in abgeschilferten Zellen vorkommend. Sertolizellen meist negativ. Tunica propria negativ. Leydigzellen negativ. Kapillaren . - Insgesamt erhaltene Aktivität der basalen Zellstreifen, sonst negativ. Keine Kontrolluntersuchung.
- Fall 12 : Sch., Otto, Elektriker, 31 Jahre (Histol.Nr.294/57)
- Klin. Diagnose : Hochgradige Oligospermie (Hoden beiderseits verkleinert, links Varicocele, Parenchym matschig, graubraun).
- Histol. Befund : Rechts geringere, links stärker ausgeprägte Tubuluschädigung; rechts in ca. der Hälfte der Tubuli noch einzelne Spermien nachweisbar, links nur noch in ganz vereinzelt unreifen Vorstufen und degenerative Riesenkernformen. Außerdem hier hochgradige Kaliberverminderung, peritubuläre Fibrose mit nur mäßiger Basalmembranverdickung, geringe Elastose; vermehrtes Vorkommen geschlängelter, epitheloidmodifizierter Gefäßwandabschnitt. - Leydigzellen z. T. in kleinen Nestern, z. T. unscharf gegenüber fibroblastenartigen Elementen abgegrenzt, z. T. einzeln verstreut. Lipoidgehalt im ganzen mäßig verringert. In den Tubuli nur geringe, vorwiegend basale Lipoidtröpfchen der Sertolizellen.
- Beurteilung : Hochgradige Tubulusschädigung links (Stadium III), geringer ausgeprägte rechts (vorwiegend Stadium II).
- Histochemischer Befund : Unregelmäßig verteilte Phosphatase in den Tubuli. Einzelne deutlich positiv, andere praktisch negativ oder nur Kerne . Positiv sind vor allem die größeren Tubulusabschnitte unter Betonung der Peripherie, sowie frei im Lumen liegender abgestoßener Zellen. Sertolizellen , teilweise auch (?), staubförmige Zytoplasmagranulation. - Spermatogonien , teilweise als durchgehendes, basales, schwarzes Band unter Aussparung der teilweise schwach gefärbten Kerne. - Spermatozyten besonders in größeren Tubuli deutlich . - Reifere Elemente: Kern positiv, im Zytoplasma . - Tubuluswand: Positive Fibro-

zytenkerne, unregelmäßig positive, teilweise doppelkonturierte Basalmembran. - Interstitium: Gefäße . Leydigzellen fast alle negativ, einzelne . Teilweise Diffusionsartefakte.
Keine Kontrolluntersuchung.

Fall 13 : Sch., Walter, Schüler, 13 Jahre (Histol.Nr.557/56)

Klin. Diagnose : Kryptorchismus (Operation wegen Retentio testis, nachdem bisher erfolglos mit hohen Dosen Testosteron behandelt).

Histol. Beurteilung : Infantile Parenchymstrukturen mit degenerativen Zell- und Wandveränderungen der Tubuli. Keinerlei intratubuläre Reifungsstrukturen erkennbar. Leydigzellen stellenweise schlecht entfaltet, in der Mehrzahl im Ruhestand erscheinend. Auffällig ist eine Änderung und Verbreiterung der Basalmembran.

Histochemischer Befund : Tubuli mit Ausnahme einzelner basaler Zellelemente negativ. In den letzteren Kern und Zytoplasma Mehrzahl der Tubuli aber gänzlich negativ. Kapillaren und Gefäßendothelien mäßig positiv, Interstitium sonst negativ. Eine gewisse leichte Anfärbbarkeit der Tubuli , möglicherweise nur artefiziell hervorgerufen.
Keine Kontrolluntersuchung.

XIV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE.

Untersucht wurde die Verteilung der alkalischen Phosphatase an 13 Hodenbiopsien. Eine Abhängigkeit der Fermentreaktion in Bezug auf die Schädigung des Hodenparenchyms, insbesondere des Tubulusapparates kann im allgemeinen als gegeben betrachtet werden. Zwar decken sich die einzelnen histochemischen Befunde nicht immer genau miteinander, jedoch ist die Tendenz einer Abnahme der Aktivität proportional dem Grad der Tubulusschädigung, bzw. der Hodenatrophie nicht zu verkennen. In einzelnen Fällen zeigen sich bei vorwiegend negativem Reaktionsausfall noch fleckförmiges Erhaltenbleiben der Reaktion. Hierbei muß die Frage offen bleiben, ob es sich nicht in diesen Fällen um diffusionsbedingte Ergebnisse handelt.

Die LEYDIG-Zellen sind bei gering geschädigten Hoden negativ, bei fibroblastenartiger Umwandlung zum Teil positiv gefunden worden, in ausgesprochenen LEYDIG-Zellhyperplasien - bei den Fällen 1.6 und 7 - einmal stark, einmal am Rande positiv.

Die Kapillaren im Interstitium zeigen immer einen mehr oder minder stark positiven Befund und keine Abhängigkeit vom Schädigungsgrad.

Bei den einzelnen Befunden ist die Möglichkeit eines Artefakts mit in Betracht zu ziehen. So fanden wir einmal (Fall 4) LEYDIG-Zellen, die vorwiegend negativ waren. Außer diesen waren noch LEYDIG-Zellnester mit schwach positiver Reaktion eingestreut.

XV. ZUSAMMENFASSUNG.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, einen Überblick über die histochemischen Untersuchungsergebnisse sowohl an tierischen als auch an menschlichen Hoden zu geben.

Beweisend für die innersekretorische, testosteronproduzierende Funktion der LEYDIGschen Zwischenzellen ist der fluoreszenzmikroskopische Nachweis des Testosteron, wie er WISLOCKI an Hirschhoden und BURKL an Rattenhoden erstmals gelang. Dabei ist es möglich, durch vergleichende Beobachtungen mit Reinsubstanz des Testosterons, die charakteristische Grünfluoreszenz der LEYDIG-Zellen zu ermitteln (BURKL).

Nicht den gleichen Grad von Spezifität für den Nachweis der Androgenproduktion der LEYDIG-Zellen haben die histochemischen Methoden von ASHBEL und SELIGMAN, sowie von POLLOCK. Die erstere bringt aktive Karbonylgruppen zur Darstellung, z. B. 17-Ketosteroide, die letztere verwendet Phenylhydrazin zur Sichtbarmachung von Steroidkomplexen.

Untersuchungen auf Vitamin C geben stets reichliches Vorkommen in den LEYDIG-Zellen. Im Tubulusinneren fehlt Vitamin C fast vollständig. Ähnliches gilt für den Nachweis lipoider Aldehyde im Sinne des sogenannten "Plasmals" (FEULGEN).

Das Kohlenhydrat Glycogen findet sich in den SERTOLI-Zellen, in den Spermatogonien und in den Spermatozyten I. Ordnung. Im Interstitium fehlt es dagegen.

Die Beschreibung von Cholesterin im menschlichen Hoden ist nicht einheitlich. Die Mehrzahl der Autoren berichten über sein Vorkommen in den interstitiellen Zellen (und im Keimepithel?) und stehen damit im Gegensatz zu MANCINI, NOLAZCO und DE LA BALZE, die in keinem Hodenabschnitt jenes Lipoid gefunden haben. Dieser negative Befund wird von LONG und ENGLE durch eine rapide biochemische Umwandlung der Vorstufe Cholesterin in Steroidhormone erklärt.

In einem eigenen Abschnitt wurde die Schädigung des Hodenparenchyms durch Östrogene behandelt. Die frühesten Veränderungen finden sich am germinativen Epithel (u. a. Zunahme von Lipoiden und Glycogen).

Im fortgeschrittenen Stadium kommt es zur peritubulären Fibrose und einem Sistieren der Spermatogenese. Im Interstitium fällt das Verschwinden normaler LEYDIG-Zellen auf und die Anhäufung fibroblastenähnlicher Zellelemente. Wird die Östrogentherapie zu einem Zeitpunkt unterbrochen, in dem Teile des Samenepithels noch nicht abgestoßen sind, kann es zu einer Regeneration kommen.

Die Befunde über die Verteilung der alkalischen Phosphatase im tierischen, wie auch im menschlichen Hoden, weichen bei den einzelnen Autoren voneinander ab. Die Mehrzahl beschreibt jedoch eine enzymatische Aktivität in allen tubulären Elementen, allerdings mit abnehmender Intensität von den Vorstufen bis zu ausreifenden Spermien. Die SERTOLI-Zellen zeigen im Kern, wie auch im Zytoplasma eine gleichmäßige Reaktion. Unter den interstitiellen Elementen zeigen die Endothelien der Blutgefäße eine starke Phosphatasereaktion. Reife LEYDIG-Zellen sind phosphatasenegativ (fragl. Ausnahme bei KAR und GHOSH, die eine positive Reaktion der Kerne fanden). Eine Veränderung in der Konzentration wird nach Hypophysektomie und nach hormonaler Behandlung beobachtet. Immer wird ein Rückgang oder ein völliges Fehlen der alkalischen Phosphatase in allen Parenchymabschnitten beschrieben.

Die eigenen Untersuchungen am Hodenbiopsiematerial ergaben eine Abnahme der Phosphataseaktivität mit zunehmender Schädigung des Tubulusapparates. Bei fibroblastenartiger Umwandlung der LEYDIG-Zellen wurde eine positive Reaktion beobachtet. Eigenartigerweise fanden wir bei LEYDIG-Zellhyperplasie stark positive Reaktion.

Herrn Professor Dr. med. H. Schuermann danke ich für die freundliche Überlassung des Themas.

Für die wertvollen Hinweise und die großzügige Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit bin ich Herrn Dr. med. O. Hornstein zu größtem Dank verpflichtet.

XVI. LITERATURVERZEICHNIS.

- ARZAC, P. J. : Glycogen in human testicular biopsy-material.
J. Clin. Endocrin. 10, 1465-1470 (1950)
- ASHBEL, R., : Histochemical demonstration of ketosteorids
COHEN, R. B., und in normal and neoplastic testes.
SELIGMAN, A. M. Endocrinology 49, 265-281 (1951)
- ASHBEL, R., und : Endocrinology 44, 565 (1949)
SELIGMAN, A. M. zit. n. Ashbel, Cohen und Seligman
- ATKINSON, W. B., und : Endocrinology 40, 30 (1947)
ELFTMAN, H. zit. n. Dempsey, Greep und Deane
- ATKINSON, W. B., und : Endocrinology 40, 327 (1947)
ENGLE, E. T. zit. n. Dempsey, Greep und Deane
- DE LA BALZE, F. A., : Morphologic and Histochemical Changes
MANCINI, R. E., produced by Estrogenes on Adult Human
BUR, G. E., und IRAZU, J. Testes.
Fertil. and Steril. 5, 421-436 (1954)
- BENNETT, H. S. : The life history and secretion of the cells
of the adrenal cortex of the cat.
Am. J. Anat. 67, 151-227 (1940)
zit. n. Pollock u. Wislocki (1949)
- BERN, H. H. : The distribution of alkaline phosphatase
in the genital tract of the mals mammals.
Anat. Rec. 104, 361-367 (1949)
- BIDDULPH, C., : Endocrinology 38, 358 (1946)
MEYER, R. K., und zit. n. Dempsey, Greep u. Deane
McSHAN, W. H.
- BOURNE, G. : Anat. Rec. 66, (1936)
zit. n. Wallraff-Schöber
- BUCHLOH, H. : Histologische Untersuchungen über den
Lipoidgehalt menschlicher Hoden.
Dissertation Würzburg 1957
- BURKL, W. : Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis
der Sexualhormone im Rattenhoden.
Z. f. Zellforsch. 40, 379-388 (1954)

- BURROWS, H. : Biological Actions of Sex Hormones.
New York, Cambridge University Press, 1945.
zit. n. De la Balze, Mancini, Bur u. Irazu
- BUTENANDT, A., und
HANISCH, G. : Über Testosteron; Umwandlung des Dehydro-
androsterons in Androstendiol und Testoste-
ron.
Z. physiol. Chem. 237, 89 (1935)
- CHARNY, I. W. : Biopsy of testis.
J. Amer. Med. Assoc. 115, 1429 (1940)
- CLEASSON, L., und
HILLDARP, N. A. : Acta. Physiol. Scand. 14, 102-119 (1947)
- CLOETENS, R. : Biochem. Z. 307, 352 (1941)
- McCULLAGH, D. R. : Dual endocrine activity of the testis.
Science 76, 19-20 (1932)
zit. n. Pollock
- DANIELLI, F. J.,
FELL, A. B., und
KODICEK, K. : Enzymes of healing wounds; effect of diffe-
rent degrees of Vitamin C deficiency on
phosphatase activity in experimental
wounds in guinea pigs.
Brit. J. Path. 26, 367-374 (1945)
zit. n. Mancini, Nolzco, de la Balze.
- DAVID, K. : Über das Testosteron, das kristallisierte
menschliche Hormon aus Stierentestes.
Acta brev. Neerland 5, 85-108 (1935)
zit. n. Pollock
- DEANE, H. S., und
BARKER, W. L. : Studies on Testis and Ovaries, Eggs
and Sperms.
C. C. Thomas, Springfield, Ill. 1952.
- DEMPSEY, E. W.,
GREEP, R. O., und
DEANE, H. W. : Changes in the distribution and concentration
of alkaline phosphatases in tissues of the rat
after hypophysectomy or gonadectomy, and
after replacement therapy.
Endocrinology 44, 88-103 (1949)
- v. EBNER, V. : Zur Spermatogenese bei den Säugetieren.
Arch. f. mikrosk. Anat. 31 (1888)
zit. n. Kunze
- ELFTMAN, H. : The Sertoli-cell. In:
Studies on Testis and Ovaries, Eggs and
Sperms.
C. C. Thomas, Springfield, Ill. 1952.

- EMMENS, C.W., und : Effects of exogenous estrogens on male
PARKES, A.S. : mammals. In:
Harris, R.S. and Thiemann, K.V. (eds.):
"Vitamins and Hormones".
New York, Academic, 1947, vol. 5
- EVERETT, J.W. : Endocrinology 41, 364-377 (1947)
zit.n. Long u. Engle
- FALLER, A. : Histochemische Untersuchungen über das
Vorkommen von Ascorbinsäure im Hoden
und Nebenhoden von Ratten verschiedener
Lebensalter.
Z. mikrosk. anat. Forsch. 49, 333-358 (1941)
- FEIGIN, J., : Histochemical studies on tissue enzymes.
WOLF, A., und VI. A difficulty in the histochemical locali-
KABAT, E.A. : sation of alkaline phosphatase in nuclei.
Am. J. Path. 26, 647-659 (1950)
- GARDNER, W.U. : Studies on steroid hormones in experimental
carcinogenesis. In:
PINCUS, G. (ed.) Recent Progress in Hor-
mone Research.
New York, Academic, 1947, Band 1.
- McGEE, L.C. : The effect of injection of a lipoid fraction
of the bull testicle in capons.
Proc. Inst. Med. Chicago 6, 242 (1927)
zit.n. Pollock
- GIROUD, A., und : C.R. Soc. Biol. Paris 115, (1934); 116, (1934)
LEBLOND, C.P. : zit.n. Wallraff-Schöber
- GOMORI, G. (1941) : The distribution of phosphatase in normal
organs and tissues.
J. Cellul. Comp. Physiol. 17, 71-83 (1941)
- GREEP, R.O., und : In Gordon, E.S. :
CHESTER JONES, I. : Symposium on Steroid Hormone.
Madison, Wisconsin, University of Wisconsin
Press, 1950.
- v. HANSEMAN : Über die sogenannten Zwischenzellen des Ho-
dens und deren Bedeutung für pathologische
Veränderungen.
Virch. Arch. 142, 538-546 (1895)
zit.n. Kunze

- HANES, F. M. : The relation of the interstitial cells of Leydig to the production of an internal secretion by the mammalian testis. J. Exper. Med. 13, 338-354 (1911)
- HERTZ, R. : Endocrinology 37, 1 (1945)
zit. n. Dempsey, Greep und Deane
- HOTCHKISS, R. S. : Amer. J. Surg. 47/45 (1939)
zit. n. Zehetgruber
- HOTCHKISS, R. S. (1948) : A microchemical reaction in the staining of polysaccharide structure in fixed tissue preparations.
Arch. Biochem. 16, 131-141 (1948)
- HOWARD, R. P.,
SIMMONDS, F. A., und
ALBRIGHT, F. : Testicular deficiency: A clinical and pathological study.
J. Clin. Endocrin. 10, 121 (1950)
- HUGGINS, C., und
RUSSELL, P. S. : Endocrinology 39, 1 (1946)
zit. n. Dempsey, Greep und Deane
- HUHNER, M. : Sterility in the Male and Female.
New York 1913
- JAKOBSON, E. : Zur pathologischen Histologie der traumatischen Hodenentzündung.
Virch. Arch. 75, 349-398 (1879)
- KABAT, E. A. und
FURTH, J. : A histochemical study of the distribution of alkaline phosphatase in various normal and neoplastic tissues.
Am. J. Path. 17, 303-318 (1941)
- KAR, A. B., und
GHOSH, A. : Studies on cytochemistry of hormon action. Part X.- The hormonal modification of alkaline phosphatase activity in the testis and in some male genital accessories of the guinea pig.
Proc. Nat. Inst. Sci. India 18, 197-205 (1952)
- KARWICKA, M. D. : Über das physikalische Verhalten und das physiologische Vorkommen der doppelbrechenden Lipide.
Zieglers Beitr. path. Anat. 50, 437-485 (1911)
- KAWAMURA : Die Cholesterinverfettung . Jena 1911
zit. n. Kunze

- KUNZE, A. : Das physiologische Vorkommen morphologisch darstellbarer Lipoide in Hoden und Prostata.
Arch. f. mikros. Anat. 96, 387-434 (1922)
- LEOPOLD, P. G. : Über den histopopochemischen Nachweis von Vitamin C im Zentralnervensystem (mit Berücksichtigung der Epiphysis cerebri).
Zugleich ein Beitrag zur Frage der Spezifität der Vitamin C Reaktion.
Z. Zellforsch. 31, 502-512 (1941)
- LONG, M. E., und
ENGLE, E. T. : Cytochemistry of the Human Testis.
Annals of the New York Science 55,
619-628 (1952)
- LEVIN, L., und
JAILER, J. W. : Endocrinology 43, 154-166 (1948)
zit. n. Long und Engle
- LIPP, W. : Histochemische Methoden.
Lieferung V, 1954
Verlag R. Oldenburg, München
- v. LEYDIG, F. : Zur Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane und Analdrüsen der Säugetiere.
Z. f. wiss. Zool. 2, (1850)
zit. n. Kunze
- LYNCH, K. M. jr., und
SCOTT, W. W. : The Sertoli cells as related to age of man experimental alterations of the pituitarygonad axis in the animal.
Fertil. and Steril. 3, 35-48 (1952)

- MANCINI, R. E.,
NOLAZCO, J. und
de la BALZE, F. A. : Histochemical study of normal adult
human testes.
Anat. Rec. 114, 127-147 (1952)
- McMANUS, J. F. : Stain Technol. 23, 99-108 (1948)
zit. n. Long und Engle
- MARTINS, T., und
ROCHA, A. : Regulation of the hypophysis by the testicle
and some problems of sexual dynamics.
Endocrinology 15, 420-434 (1931)
zit. n. Pollock
- MAYNO, G., und
ROUILLER, Ch. : Die alkalische Phosphatase in der Biologie
des Knochengewebes.
Virch. Arch. 321 1-61 (1951)
- MONTAGNA, W. (1952a) : Some cytochemical observations on human
testes and epididymides.
Annals of New York Acad. of Science
55, 629-642 (1952)
- MONTAGNA, W. (1952b) : The distribution of lipids, glycogen and
phosphatases in the human testes.
Fertil. a. Steril. 3, 27-34 (1952)
- MONTAGNA, W., und
HAMILTON, J. B. : Histological studies of human testes.
I. The distribution of lipids.
Anat. Rec. 109, 635-660 (1951)
- MOORE, C. R., und
GALLAGHER, F. T. : Seminal vesicle and prostate function as
a testis-hormon indicator; electric ejaculation
test.
Am. J. Anat. 45, 39-69 (1930)
- NELSON, W. O. : In Pincus, G. (ed.): Recent Progress in
Hormone Research.
New York Academic 3, (1948)
zit. n. de la Balze, Mancini, Bur u. Irazu.
- NEUMANN, K. : Über histochemisch-quantitative Phosphatase-
bestimmung.
Verh. Anat. Ges. 1951, S. 165-172
48. Versammlung in Kiel, 22.-25. 8. 1950.
- PERLMAN, P. L. : The functional significance of testes
cholesterol in the rat.
Endocrinology 46, 341-346 (1950)

- POLLOCK, W. F. : Histochemical studies of the interstitial cells of the testis.
Anat. Rec. 84, 23-29 (1942)
- POSNER, C. : Die diagnostische Hodenpunktion.
Berl. Klin. Wschr. 42, 1119 (1905)
- ROBINSON, R. : Erg. Enzymforsch. 1, 280 (1932)
zit. n. Mayno u. Rouiller
- ROCHE, J., und
van THOAI, N. : Adv. Enzymol. 10, 83 (1950)
zit. n. Mayno u. Rouiller
- ROMEIS, B. : Mikroskopische Technik
Leibnitz-Verlag, 15. Aufl., München 1948
- RUZICKA, L., und
WETTSTEIN, A. : Über die künstliche Herstellung des
Testikelhormons Testosteron.
Helvet. chim. acta 18, 1264 (1935)
- SAYERS, G., und
SAYERS, M. H. : Recent Progress in Hormon Research
2, 81-115 (1948)
zit. n. Long u. Engle.
- SELIGMAN, A. M., und
ASHBEL, R. : Bull. New Engl. Med. Center 11, 85 (1949)
zit. n. Ashbel, Cohen und Seligman
- SELIGMAN, A. M., und
ASHBEL, R. : Cancer 4, 579 (1951)
zit. n. Ashbel, Cohen und Seligman
- SELIGMAN, A. M.,
FRIEDMAN, O. M., und
HERTZ, J. E. : Endocrinology 44, 584 (1949)
zit. n. Ashbel, Cohen und Seligman
- SCHÜTZ, W. : Histologische Befunde am menschlichen
Hoden nach Hormonbehandlung des Pro-
statacarcinoms.
Langenbecks Arch. u. Dtsch. Z. Chir.
271, 65-76 (1952)
- SLOTOPOLSKY, B., und
SCHINZ, H. R. : Handbuch der biologischen Arbeitsmetho-
den von E. Abderhalden Abt. V, Teil 3b,
1927.
- SOULAIRAC, A., und
THIBAUT, C. : L'activité phosphatasique dans le tractus
genital des Mammifères. I. Localisation
chez le Rat male et modifications experi-
mentales.
C. R. Acad. Sci. Paris 227, 446-448 (1948)
zit. n. Bern

- SUZUKI, YOSHIMURA, und TAKAISHI : Tokyo. Imp. Univ. Coll. Agr. Bull. 7, 503 (1907)
zit. n. Mayno und Rouiller
- TAKAMATSU, H. : Trans. jap. path. Soc. 29, 492 (1939)
zit. n. Mayno und Rouiller
- TONUTTI, E. : Über die Bindung des Vitamin C an eine Trägersubstanz in der Zelle.
Z. mikrosk. anat. Forsch. 42, 221-232 (1937)
- TONUTTI, E. : Zur Biologie des Vitamin C.
Z. klin. Med. 132, 443-465 (1937)
- TONUTTI, E. : Ergebnisse histochemischer Vitamin-C-Untersuchungen.
Protoplasma (Berl.) 31, 151-158 (1938)
- WALLRAFF, J., und BEDNARA-SCHÖBER, M. : Vitamin-C- und Plasmaluntersuchungen an den Geschlechtsorganen des Mannes.
Z. f. mikrosk.-anat. Forsch. 51, 585-609 (1942)
- WILHELM, S. F., und SHWARTZ, A. M. : Effect of short wave therapy on guinea pig testis.
J. Urol. 40, 335-338 (1938)
- WILLIAMS, W. L., und CUNNINGHAM, B. : Histological changes in the rat testis following heat treatment.
Yale J. Biol. a. Med. 12, 309-316 (1940)
zit. n. Pollock
- WISLOCKI, G. B. : Seasonal changes in the testes, epididymides and seminal vesicles of deer investigated by histochemical methods.
Endocrinology 44, 167-189 (1949)
- WISLOCKI, G. B., und DEMPSEY, E. W. : Am. J. Anat. 77, 365 (1945)
zit. n. Dempsey, Greep und Deane
- ZEHETGRUBER, W. : Die Hodenbiopsie und ihre Indikationen.
Med. Klinik 52, 2202-2205 (1956)

LEBENS LAUF.

Am 28. Februar 1932 wurde ich in Sulingen/Bremen als Sohn des Zahnarztes Dr. Hermann Kasten und seiner Ehefrau Käthe, geb. Dodt, geboren.

Im Jahre 1933 siedelten meine Eltern nach Würzburg über. Ab dem 6. Lebensjahr besuchte ich die Volksschule und trat 1942 in das Staatliche Realgymnasium in Würzburg ein. Diese Anstalt besuchte ich bis zum Jahre 1949. Vom September 1950 an war ich Schüler der Städtischen Oberrealschule Marktbreit, an der ich im Juli 1952 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1952/53 immatrikulierte ich mich als Student der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg. Meine Zahnärztliche Vorprüfung bestand ich im Juli 1954. Im Mai 1957 legte ich das Zahnärztliche Staatsexamen ab. Seit Juni 1957 war ich mit der Fertigstellung dieser Arbeit beschäftigt.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Lothar Kasten

